

⑪ 公表特許公報 (A)

平2-503269

⑫ 公表 平成2年(1990)10月11日

⑬ Int.Cl. ⁵ C 12 P 21/02	識別記号 C	府内整理番号 8214-4B 8717-4B 6807-4B	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	部門(区分) 1 (1) A B※
		C 12 N 15/00 5/00		

(全 51 頁)

⑭ 発明の名称 可溶性T4の誘導体

⑮ 特願 平1-503131

⑯ ⑰ 出願 平1(1989)2月24日

⑭ 翻訳文提出日 平1(1989)10月24日

⑮ 国際出願 PCT/US89/00762

⑯ 国際公開番号 WO89/08143

⑰ 国際公開日 平1(1989)9月8日

優先権主張 ⑭ 1988年2月24日 ⑮ 米国(US) ⑯ 160,348

⑭ 発明者 マドン, ポール・ジエイ アメリカ合衆国、ニューヨーク・10032、ニュー・ヨーク、ヘイブン・アベニュー・60

⑭ 出願人 ザ・トラステイーズ・オブ・コロンビア・ユニヴアーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク

アメリカ合衆国、ニューヨーク・10027、ニュー・ヨーク、ウエスト・ワンハンドレッド・アンド・シックスティーンス・ストリート・アンド・ブロードウェイ (番地なし)

⑭ 代理人 弁理士 川口 義雄 外2名

⑭ 指定国 AU, DK, FI, HU, JP, KR, NO

最終頁に続く

添書(内容に変更なし)

請求の範囲

(1) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする治療剤。

(2) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+106までが約+351から約+369までのアミノ酸配列に融合したものであることを特徴とする治療剤。

(3) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質と特異的に結合体形成可能な治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+185までのものであることを特徴とする治療剤。

(4) 請求項1、2又は3のいずれかに記載の治療剤の有効量と医薬的に通用可能な担体とから成る医薬組成物。

(5) 請求項4の医薬組成物の有効量を患者に処方することから成るヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法。

(6) 請求項1、2又は3のいずれかに記載のポリペプチドをエンコードする発現ベクター。

(7) 請求項6の発現ベクターから成る宿主細胞。

(8) 細菌宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(9) 大腸菌宿主細胞である請求項8の細菌宿主細胞。

(10) 真核宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(11) 哺乳類宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(12) 肺母宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。

(13) 昆虫宿主細胞である請求項7の宿主細胞。

(14) 請求項6の発現ベクター系を連する条件で育成し、治療剤を生産させ、かくして得られた治療剤を回収することから成る請求項1、2又は3のいずれかに記載の治療剤の生産方法。

添書(内容に変更なし)

明細書

可溶性T4の誘導体

本出願は1987年10月23日出願の米国特許出願第114,244号の一部継続出願であり、該出願は1986年8月21日出願の米国特許出願第898,587号の一部継続出願であり、これらの特許出願の記載内容は本出願に含まれるものとする。

発明の背景

本明細書ではいくつかの参考文献を括弧内にアラビア数字で示し、これらの参考文献の一覧を明細書の末尾に添付した。本発明が属する分野の現状を十分に理解するために引用されたこれらの参考文献の記載内容は本出願に含まれるものとする。

Tリンパ球の異なる機能クラスは、異なる標的細胞集団の表面の抗原を認識する。ヘルパーT細胞は主としてマクロファージ及びB細胞と相互作用する。細胞障害性T細胞はより広い範囲の抗原保有標的細胞と相互作用する。これらの細胞認識事象は、エフェクター細胞及び標的細胞の双方の表面分子の特異的会合によって媒介されると推定できる。T細胞の表面の特徴は、多數の多形及び非多形タンパク質を有することであり、これらのタンパク質の大部分はTリンパ球に限定されている。これらの分子の多くはすべ

標的細胞相互作用におけるこれらの分子の重要性はモノクローナル抗体を用いた研究によって証明され得る。T4分子(または対応するマウスの分子L3T4)の特異的エピトープに対する抗体は、抗原携帯T細胞増殖、リンフォカイン遊離及びヘルパーT細胞機能を阻害する(7、8、11、12、13)。同様に、T8(または対応するマウスの分子Lyt2)に対するモノクローナル抗体は細胞障害性T細胞媒介キラー作用を阻害する(14、15)。これらの観察及びT4とT8とが有意な多形性を表わさない事実に基づいて判断すると、T4及びT8がクラスⅡ及びクラスⅠの分子の非多形領域を夫々認識すると推定し得る。

異なるエフェクターT細胞に基づく違いを有すると考えられる第2のクラスのタンパク質は、MHC分子の多形領域と会合する抗原を認識するレセプターである(16、17、18)。ヘルパーTリンパ球の相互作用は主としてクラスⅡのMHCタンパク質を発現する抗原保有標的細胞に限定され、他方、細胞障害性及びサブレッサーT細胞はクラスⅠのMHC分子を担う標的細胞に限定される(4、5、6、7、8、9)。これらの特異的相互作用は、特異的MHC分子に関連して抗原を認識する(1つまたは複数の)T細胞レセプターによって媒介

特表平2-503269(2)

てのT細胞に共通であるが、2つのクラスの表面タンパク質の違いは常にT細胞の機能クラスの違いに基づく。これらのタンパク質はT細胞-標的細胞相互作用に関与していた。

1つのクラスの表面分子はTリンパ球の主要な機能サブセット即ち表面親タンパク質T4及びT8を識別する。胸腺発達の初期に糖タンパク質T4及びT8は胸腺細胞の表面で同時に発現される(1)。末梢免疫系において、T4分子及びT8分子はT細胞の相互排除的サブセットにおいて発現され、同じ細胞においてで発現されることはない(2、3)。T4分子はクラスⅡの主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)分子を保有する標的細胞と相互作用するT細胞において発現される。他方、T8を担うT細胞はクラスⅠのMHCタンパク質を発現する標的と相互作用する(4、5、6、7、8、9)。Tリンパ球のT4集団はヘルパー細胞を含み、他方、T8集団は細胞障害性及びサブレッサー細胞の大部分を含む(8、10)。しかしながら、希少なT4⁺のT細胞は細胞障害性またはサブレッサー細胞として機能でき(8、10)、これはT4またはT8の発現がエフェクター機能よりもMHCクラスの認識に緊密に(stringently)関連していることを示唆する。T細胞-

され得る。従って、Tリンパ球はMHCタンパク質の不变決定基及び多形決定基を認識し得る独立の2つのレセプターを有するであろう。これらのレセプターは機能的に異なるT細胞集団を特異的標的とする役割を果たす。

ヒト後天性免疫不全症候群(エイズ、AIDS)の特徴は、T4⁺リンパ球が欠失していることにある。その結果として、エイズ患者ではT細胞媒介免疫性が損傷され、重大な日和見感染及び異常な新生物が発生する。エイズは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)と命名された類縁レトロウイルス(LAV、HTLV-ⅢまたはARV)の集団がTリンパ球に感染することによって発症する。これらの病原体の感染力の範囲は、その表面にT4糖タンパク質を発現する細胞に限定されている。

従って、T4糖タンパク質は標的細胞の表面の分子のレセプターとして機能するだけでなく、エイズウイルスのレセプターの機能も果たす。T4に対するモノクローナル抗体は、T4⁺細胞のin vitroエイズウイルス感染を阻止する。更に、最近の研究から、T4⁺ Tリンパ球がエイズウイルスに接触するとウイルスの110kdのエンベロープ糖タンパク質が宿主細胞のT4分子と会合することが判明した。従ってウイルスの向リンパ性はTリンパ球のサブ集団中のレセプター-T4

の限定された発現によって説明できた。

エイズではT4⁺ Tリンパ球の欠失によって細胞性免疫応答が損なわれる。また多くの場合にはエイズに伴って、殆どが亜急性脳炎(subacute encephalitis)に起因する中枢神経系(CNS)の機能障害が生じる。エイズウイルスのRNA及びDNAは感染脳から同定され、神経系疾患に罹患した患者の脳及び脛脊髄液からウイルスが単離された。これらの観察は、エイズウイルスが脳細胞に感染し、該ウイルスがエイズ患者で観察されるCNS病変の直接原因であることを示唆する。従って、エイズは向リンパ性であると同時に向神経性である。従って、T4がCNS中で発現されたのかまたは付加的な脳特異的表面分子がエイズウイルスのレセプターとして機能するのかを判断することが重要である。

T4及びT8の特異的相互作用の解明は、T4及びT8遺伝子を単離でき、それらの構造を決定し、種々の細胞環境に導入できれば容易に行なわれるであろう。T8分子をコードするcDNAの単離及び配列が最近報告された(19, 20, 21)。推定されたタンパク質配列は、T8が免疫グロブリンI鎖の可変部との相同意を含むN末端ドメインをもつ膜結合糖タンパク質であることを示す。

したヤギ抗マウス免疫グロブリンと共にインキュベートした。細胞をFACS IV Cell Sorterで分析し、VAX 11/780コンピューターにより蛍光の対数値に対する細胞数としてプロットした。非形質転換NIH 3T3細胞及びL細胞は同一のサイトフルオログラフィーパターンを示した。Fra 2.2はT3⁻、T4⁺、T8⁺、T11⁺の表現型を有する白血病T細胞系であり、LTD-4は全ゲノムDNAの転移後に得られるT4⁺一次T細胞の形質転換体である。3A⁺はT4-pMV6tk/neoレトロウイルス発現構築物で形質転換したNIH 3T3細胞系である。

第2図. T4⁺及びT4⁻L細胞及びヒト細胞に由来するRNAのノーザンプロット分析

3μgのポリ(A)⁺RNA又は12μgの全RNA(末梢T細胞及び胸腺リンパ球)を0.8%アガロース-ホルムアルデヒドゲル中で電気泳動させ、GeneScreen (New England Nuclear)に吸着させ、³²Pで標識した0.6kb T4 cDNAインサートでプローブした。T4⁺細胞はLTD-4(T4⁺、T8⁻細胞の形質転換体)、SK-7 T細胞ハイブリドーマ(T4⁺、T8⁻)、OT-CLL白血病(T4⁺、T8⁻)、Fra 2.2白血病(T4⁺、T8⁻)、T4沃化末梢Tリンパ球、及びヒト胸腺リンパ球を含む。T4⁺細胞は、非形質転換細胞、lk7(T8⁻細胞の形質転換体)、HeLa細胞、ヒト神経芽

発明の要約

本発明は、ポリペプチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパク質との複合体を特異的に形成することが可能な治療剤を提供する。本発明の1態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351～約+369のアミノ酸配列に融合した約+3～約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351～約+369のアミノ酸配列に融合した約+3～約+106の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の更に別の態様によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+3～約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法も提供する。該方法は、有効量の本発明の治療剤と医薬上許容可能なキャリヤーとを含有する有効量の医薬組成物を患者に投与することから成る。

図面の簡単な説明

第1図. OKT4及びOKT8を用いた間接免疫蛍光染色のサイト

フルオログラフィーパターン

細胞(5×10⁵)をマウスモノクローナル抗体OKT4B又はOKT8と共にインキュベートし、洗浄し、その後、FITCで標識

腫瘍細胞(IMR)、及びT8沃化末梢Tリンパ球を含む。ヒト胸腺リンパ球レーンを4倍の時間で露光し、硬調フィルムで写真撮影した。

第3図. pT4B及びT4遺伝子の制限ヌクレアーゼ地図、配列決定方法及び粗換体ベクター

A. pT4B cDNA及びT4遺伝子のBam HI 制限フラグメントのアラインメント。T4遺伝子におけるBam HI フラグメントの順序はザンプロット分析及びゲノムクローンマッピングにより決定した。pT4B及びT4遺伝子の5'末端のアラインメントを点線により示し、pT4Bの塗りつぶし領域はコーディング配列に対応する。指示した寸法の単位はキロベースである。

B. 配列決定方法。矢印はフラグメントをM13にサブクローニングし、チェーンターミネーター法(36)により配列決定することにより決定した配列範囲を示す。

C. 真核細胞発現ベクター。これらの構築物は、矢印により示すような配向を有する2つのモロニーマウスウイルスの長い末端反復LTR)を含む。pT4B cDNAを指示した配向で各ベクターのEco RI 部位にサブクローニングした。(a)T4-pVcos7構築物。(b)T4-pMV6tk/neo構築物はHSVチミジンキ

ナーゼプロモーターに融合したネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む。

第4図. 非形質転換及びT4⁺L細胞、並びにT、B及び非リンパ性ヒト細胞からのDNAのサザンプロット分析

10 μ gの細胞DNAをBam HIで消化し、0.8%アガロースゲル中で電気泳動させ、GeneScreenに吸着させ、ニック翻訳したpT4B cDNAインサートでプロープした。指示した寸法の単位はキロベースである。全てのヒトDNAには20kb、6.6 kb、4kb、1.8kb及び1kbの寸法のハイブリダイジングバンドが現れている。非リンパ性起源のT4⁺からのDNAは非形質転換細胞、ヒト線維芽細胞(CM)、ヒト神経芽腫細胞(NB)、及びHeLa細胞を含む。CB、CP58及びCP94はEBVで形質転換したヒトB細胞系に由来するDNAである。LTD-4はT4⁺一次L細胞の形質転換体である。RPMI及びHSB2はT4⁺ヒトT細胞白血病系であり、E細胞及び胸腺リンパ球(Thym.)はT4⁺T細胞を含む。OT-CLL、Jurkat(Jurk.)、Fre2.2、CEM及びMolt 4はT4⁺細胞である。g入M4はT4遺伝子の3'末端に位置する配列を含むゲノムクローンである。

第5図. レトロウイルス発現構築物で形質転換したNIH 3T3からT4抗タンパク質の免疫沈降

す。全細胞外システィンには(●)又は(○)を付した。リーダー配列領域(L)、可変領域(V)、結合領域(J)、トランスマembrane領域(TM)及び細胞周辺(CYT)領域を配列の下の水平方向の矢印により示したが、正確な境界ははつきりしていない。2つの可能なN結合グリコシル化部位(Asn-Leu-Thr)も示した(CBO)。

第7図. SP6転写から誘導されるin vitro翻訳RNA

完全な長さのT4 cDNAインサートをRNA発現ベクターpSP65(Promega Biotech)にサブクローニングした。開環したプラスマミドDNAをSP6ポリメラーゼ(40)で転写し、L-[³⁵S]-メチオニンを含有する小麦胚系(Bethesda Research Laboratories)で翻訳した。in vitro翻訳生成物を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させた(レーンT4)。ウシ下垂体RNA(BP)を対照として使用した。相対分子量(Mr)をキログダルトンで示す。

2つの独立したNIH 3T3形質転換細胞、末梢Tリンパ球及び非形質転換3T3細胞からのタンパク質をL-[³⁵S]-メチオニンで標識し、ヒラマメレクチンクロマトグラフィーにかけ、親タンパク質を沃化した。各サンプル2.5×10⁶cpmを予め清澄化し、その後、OKT4モノクローナル抗体及びタンパク質A-セファロースで免疫沈降させた。ビーズを洗い、サンプル緩衝液に溶解させ、還元(レーンa～d)及び非還元(レーンe及びf)条件下に10% SDS-ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させた。レーンaは非形質転換NIH 3T3細胞に関する。レーンbは、T4C2、即ちT4-pVcos7構築物で形質転換したNIH 3T3細胞に関する。レーンc及びeは、3A⁺、即ちT4-pMV6tk/neor構築物で形質転換したNIH 3T3細胞に関する。レーンd及びfは末梢ヒトTリンパ球に関する。相対分子量(Mr)をキログダルトンで表す。

第6図. T4 cDNAのヌクレオチド配列及びT4タンパク質の翻訳配列

本図は、第3B図に要約した配列決定方法に従って得られたcDNAクローンpT4Bのヌクレオチド及び予想されるアミノ酸配列図である。アミノ酸配列の上に示した数字はアミノ酸残基の位置を表す。右側の数字はヌクレオチド位置を表

第8図: 細胞膜にまたがるT4グリコプロテインの簡略説明図

T4はタンデムVJ様ドメイン(V₁J₁-V₂J₂)と、膜にまたがる(membrane spanning)疎水性セグメント(影の部分)と、荷電(charged)細胞質領域(CYT)とからなる。細胞外部分の2つの潜在的N結合グリコシル化部位は(---)で示されている。T4遺伝子中のイントロン2-8の位置も()で示されている。

第9図:T4の可変領域、接続領域及びトランスマembrane領域とイムノグロブリン遺伝子類メンバとのアラインメント上

A. T4の可変領域アミノ酸配列と、マウスカッパシ鎖イムノグロブリンJ606(66)、T8(20)、ヒトT細胞抗原レセプター-β-鎖YT35(97)及びヒトT細胞抗原レセプター-α-鎖HPB-MLT α (98)とのアラインメント。J鎖可変領域内の不变残留物(inv.)はこのアラインメント中に含まれる。このアラインメントは、箱で囲まれた残留物として現れるT4に対するアイデンティティーと構造ホモロジーとを最大化するために行った。文字A、B、C、C'、D、E、及びGを付した配列の下の線はβ-ストランドを形成する残留物を示す。β-ス

トランドCはJ配列中に統一している。

B. T4の接続領域(joining region)アミノ酸配列とT細胞抗原レセプター β -鎖のコンセンサスJ配列、イムノグロブリンラムダ及びカッパ λ 鎖、及びヒトT細胞レセプター α -鎖のJ配列とのアラインメント(99)。

C. T4のトランスメンブラン領域とMHCクラスII β -鎖とのアラインメント(100)。推定上のトランスメンブランドメイン(TM)は配列の下に示されている。

第10図:ヒト染色体DNAのT4遺伝子の制限ヌクレアーゼマップ

9つのエキソンの位置をゲノムクローンマップの作成、サザンプロット分析及びヌクレオチド配列によって調べた。リーダー配列(L)、可変領域と思われる領域(V)、接続領域と思われる領域(H)、トランスメンブラン領域(TM)及び細胞質(CYT)領域は箱で囲まれている。開始コンセンサス配列で包囲されたメチオニンコドンの位置はリーダーエキソン(L)の冒頭部分に示されている(ATG)。終結コドントGAは第2細胞質エキソン(CYT)の末尾に示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

第11図:組換えレトロウイルス発現ベクター及び形質転換

してプロットした。感染ウイルス力値(10-50)は、培養物の50%がウイルスに関して陽性を示す時の希釈度の逆数として示す(47)。自然に単離したT4⁺細胞は、フィトヘマグルチニン(PHA)で刺激された正常抹消リンパ球(←→)とT細胞系CEM(○—○)とを含む。トランスフェクションにかけられたT4⁺細胞系はHSB2-T4⁺T細胞(▲—▲)とRaji-T4⁺B細胞(●—●)とを含む。トランスフェクションにかけられたT8⁺細胞系HSB2-T8⁺及びRaji-T8⁺(D—D)は、これらの検査の対照として使用した。

第13図:T4⁺HeLa形質転換細胞中のシンシチウム(Syncytium)の形成

A. 2×10^4 の単層HeLa-T4⁺形質転換細胞を 2×10^4 のエイズウイルス産生H9細胞と混合し、37°Cでインキュベートした。18時間後に培養物を調べたところ、単層シート中の核の90%以上がシンシチウム中に含まれていた。

B. 接種時に抗R4Aモノクローナル抗体(1:20)を前記混合培養物に加えた。18時間後に培養物を調べたところ、細胞融合は全く見られなかった。

培養物を倍率160xで撮影した。

第14図:T4⁺形質転換細胞へのエイズウイルス結合の流動相

細胞の形成

A. 組換えレトロウイルス発現ベクター。pMV7は矢印の方向で直接的に繰り返される2つの Moloney ネズミ sarcoma ウィルス LTR(long terminal repeats)を含む。pMV7はまた、HSVチミジンキナーゼプロモーター(lk)に融合された細胞ネオマイシンホストランスマーカー遺伝子(neo)も含む。T4(T4B)(70)又はT8(T8F1)(20)をコードする完全な長さのcDNAインサートを矢印の方向に従って Eco RI 部位にサブクローニングした。夫々T4-pMV7及びT8-pMV7が形成された。コーディング配列は影の部分で示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

B. レトロウイルスを介する遺伝子トランスファーの方法

第12図:自然に単離され且つ形質転換されたT4⁺細胞の感染効率

細胞に、10倍ずつで希釈した一連のエイズウイルス希釈物を接種し、37°Cで18時間インキュベートし、洗浄後にマイクロカルチャーでプレーティングした(plated in microculture)。感染後12日目に、感染培養物の頻度をELISA(enzyme-linked immunoabsorbent assay)によって調べた(48)。結果を、陽性培養物%対ウイルス希釈度logと

統計調査分析

コラムA. 細胞(5×10^4)をフルオレセイン結合抗T4A(—)又は抗TB(---)モノクローナル抗体と共にインキュベートし、細胞蛍光定量法(cytofluorometry)によって分析した。抗体B. 細胞(5×10^4)をバッファ(---)又はエイズウイルス(—)と共にインキュベートし、洗浄し、フルオレセイン結合抗エイズウイルス抗体と共にインキュベートし、細胞蛍光定量法によって分析した。

コラムC. 細胞(5×10^4)をバッファ(---)又はエイズウイルスの前の抗T4Aモノクローナル抗体(—)もしくはエイズウイルスの前の抗TBモノクローナル抗体(—'—')と共にインキュベートした。洗浄後、フルオレセイン結合抗エイズウイルス抗体を加え、細胞を細胞蛍光定量法によって分析した。

各細胞系の蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)は水平にアレンジされる。

第15図:ヒト及びマウス脛細胞、リンパ球及び骨髄細胞から誘導したRNAのノーザンプロット分析

A. ヒトRNA試料のノーザンプロット分析。Raji(T4⁺B細胞系)、U937(T4⁺单球細胞系)及びJurkat(T4⁺T細胞系)か

らのポリ(A)⁺RNA 1マイクログラムと、大脳皮質からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムとを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond(Amersham)上にプロットし、³²P-標識T4cDNAインサート、pT4B(70)でプロープした。

B. マウスRNA試料のノーザンプロット分析。前脳及び後脳3T3細胞(雄性芽細胞系)からのポリ(A)⁺RNA 5マイクログラムと、胸腺からの総RNA 20マイクログラムとを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、Hybond上に移し、³²P-標識L3T4cDNAインサート、pL3T4Bでプロープした。

第16図: pST4DHFRのプラスミドマップ

プラスミドpST4DHFRは、T4のリーダー及び細胞外セグメントをコードするT4cDNAクローンpT4Bのbp 1-1257を含むpUC18誘導体である。このsT4 cDNAをSV40初期(early)プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域の前のTAA終結コドン(インセット)を含む合成リンカーとの間に挿入する。sT4発現カセットは、β-グロビンプロモーターとマウスdhfrコーディング配列とSV40ポリアデニル化領域とで構成されたマウスdhfr発現カセットに結合する。

50滴定を行った。

A. 8日目にHIVに関して陽性を示した培養物%対ウイルスイノキュラム希釈度のプロット。

B. 4日目の、8日目及び12日目のID-50(培養物の50%が陽性を示す時のウイルス希釈度の逆数)のプロット。

C. HIVの10⁻³希釈物を使用した場合の、8日目にHIVに関して陽性を示した培養物%対種々のsT4濃度のプロット。

(以下余白)

第17図: 蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)

sT4はT4-CEM細胞へのHIVの結合を阻止する。細胞をバッファ(—)か、sT4と共に予めインキュベートしたHIV(—)か又は非形質転換DXB-11細胞(---)からの濃縮対照上澄みと共に予めインキュベートしたHIVと共にインキュベートし、洗浄し、フルオレセイン結合抗HIV抗体に曝露し、細胞蛍光定量法によって分析した。蛍光ヒストグラム(細胞数対蛍光強度)を示す。

第18図: sT4によるHIV感染性の阻害

HIVイノキュラムの感染性滴定(ID-50アッセイ)を行った。10倍ずつ希釈した一連のウイルスイノキュラム希釈物をインジケーター細胞(PHAで刺激したヒトリンパ球)と共に18時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄し、マイクロカルチャードプレーティングする(培養当たり 1×10^3 の細胞、希釈物当たり10の培養)。4日目、8日目及び12日目に、抗原捕捉アッセイによって上澄みを検査し、HIVを調べた。細胞の接種の30分前にHIV希釈物に加え且つ実験の箇中培養地中に維持した9.6μg/mlのsT4を含む媒質(■)、又は最初の18時間のイノキュラムの後で導入したsT4を含む培地(○)、あるいはsT4を含まない培地(□)(対照)の中でID-

発明の詳細

本発明は、オリベアチドを含有するヒト免疫不全ウイルスエンベローブグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得る治療薬を提供する。本発明の1つの実施態様におけるオリベアチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含む。本発明の別の実施態様におけるオリベアチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+106を含む。本発明の更に別の実施態様におけるオリベアチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者を治療するための治療薬として有効な医薬的組成物を提供する。この医薬的組成物は、ヒト免疫不全ウイルスエンベローブグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得て且つ水溶液に可溶性を示す本発明のアミノ酸配列と、医薬的に許容可能なキャリヤとを含有する。かかる医薬的に許容可能なキャリヤは、本発明が関与する分野では公知であり、限定的ではないが、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mのホス

フェート緩衝液または0.8%生理食塩水を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法を提供する。この方法は、患者に感染した免疫不全ウイルスをT4⁺細胞に感染できないようにするために、患者に、医薬的に許容可能なキャリヤと、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコプロテインと複合体を特異的に形成し得て且つ水溶液に可溶性を示す本発明のアミノ酸配列とを含有する医薬的組成物を有効量投与することからなる。

sT4タンパク質のin vitro生化学的及び免疫学的特性の特徴化は、このタンパク質がAIDSの予防及び治療に価値があることを示した。研究によって、sT4タンパク質はウイルスの細胞外及び細胞から細胞への伝播の阻害剤として作用することが判った。培養において、sT4はウイルスがT4⁺標的細胞に結合するのを遮断することが判ったので、sT4を感染者に投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害するよう作用するであろうと考えられる。従ってsT4は、AIDS治療の予防薬及び治療薬の両方として価値がある。

予防薬としてのsT4は、この病気に対して高い危険性を有する個体、またはウイルスに対する抗体の存在によって

な治療薬は、ウイルス媒介の感染及び細胞から細胞への伝播を防止すべきである。更にsT4は、他の抗ウイルス剤、例えばアジドチミジン(AZT)と組み合わせて使用してもよい。

本発明のsT4タンパク質は、T4⁺細胞機能の阻害剤としての有効性も有する。多くの研究によって、免疫耐性、特に自己免疫疾患の発病及び進行並びに宿主特異的移植片拒否反応におけるCD4レセプタ(CD4はヒトT4レセプタ及び他の哺乳動物細胞におけるその該等物質に対する一般用語である)の重要な役割が示された。sT4に特に関係するのは抗CD4 Mabsを用いた観察である。これらのCD4レセプタとの会合によって、これらのMabsの特定のものは自己免疫応答及び移植片拒否反応改善する。かかる作用の例としては、T細胞in vitro機能、例えば特定の抗CD4 Mabsによる抗原誘導性増殖、リンホカイン分泌及びヘルパー細胞機能の障害、マウス狼瘡の微候を阻害するための抗CD4 Mabsの投与による全身性狼瘡紅斑(systemic lupus erythematosus)の治療、並びに、マウスCD4レセプタに対するマウスMabを1回投与することにより同種移植が受容されるマウスにおける移植研究を挙げることができる。

HIVに暴露されたことが判る個体に投与される。病気の早期段階または微候が現れる前に有効量のsT4を投与すると、T4⁺リンパ球のHIV感染を阻害するように作用する。治療薬としては、HIVに感染した人にsT4を投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害するように作用する。

HIV感染細胞と他のT4⁺リンパ球との融合もまたウイルス伝播の経路であるらしい。更に融合は、感染個体におけるT4⁺リンパ球機能の損傷及び最終的にはT4⁺リンパ球の喪失の一部原因となり得る。細胞融合は、ウイルスエンベロープ遺伝子産生物及びT4レセプタの両方に依存し、OKT4Aまたは類似のモノクローナル抗体(Mabs)(120)によって阻害され得る。sT4は細胞融合に干渉し、従ってウイルスの細胞から細胞への伝播及びT4⁺リンパ球機能の損失を減少させることが期待される。

T4レセプタは同一構造であって、sT4は、全てのHIVを含む、T4レセプタの表面ドメインを認識するウイルスの共通の阻害剤であると思料される。

sT4は他の薬剤と組み合わせて、例えば逆転写酵素、プロテアーゼまたは*lat*のごとき他のHIVタンパク質に対する薬剤と共同して使用することができる。HIVに対する有効

MabがCD4に結合した結果の分子は明確ではないが、MabsはCD4とその配位子との会合を遮断することができる。この配位子はMHCクラスⅡ抗原(121,122)における保存エピトープであることが立証されている。しかしながら、これらの同じMabsの少なくとも幾つかは、見掛けのクラスⅡ独立経路によってCD4細胞活性化を阻害する。

更にsT4は、恐らく、通常はT4レセプタの表面ドメインと相互作用する細胞外側の分子に結合することにより、T4細胞の拮抗物質としてT細胞相互作用を阻害すると思料される。MabsとsT4との区別は、重要な機能性結果をもたらした。例えば、T4に対する幾つかのMabsはT4細胞において応答を引き出す一方、sT4は、MHCクラスⅡ抗原を発現する細胞において応答を引き出すことができる。また、T4のその推定クラスⅡ配位子に対する親和性は、T4に対するMabsの親和性が高いのと比較すると極めて低いようである。従って、Mabs及びsT4は同じ過程に干渉し得るが、異なる様的分子及び異なる様的細胞に影響を及ぼす。

予防薬または治療薬として、T4は非経口、好ましくは静脈内投与される。薬剤は、点滴または注射によって、例えば毎日、毎週または毎月投与することができる。sT4投与

の量及び割合は、血液中に有効量のsT4が維持されるよう選択される。別の投与態様としてはsT4を透析剤として使用する体外投与がある。

更に本発明のsT4タンパク質は、T4細胞相互作用の治療薬または阻害剤として作用する天然、合成または組換え分子に対する試薬として使用することができる。

例えば、sT4タンパク質は、T4レセプタの表面ドメイン相互作用の拮抗物質を分析するための他の試薬と組み合わせて使用することができる、生化学的に純粋な水溶性試薬を提供するための、ELISAに基づく方法によって測定されるタンパク質相互作用の分析といったふるい分け分析に使用することができる。例えば、sT4はHIV env タンパク質又はHIV env タンパク質を含有する混合物に結合するので、これは、ウイルス結合の阻害剤のふるい分けに使用することができる。sT4がHIV env タンパク質を発現する細胞に結合することを示す in vitro データに基づき、sT4も、HIV in vivo 感染細胞に対する選択的標的分子として作用することができる。標的特異的キャリヤタンパク質として、sT4は、例えば、感染細胞に対する細胞障害剤の分配のためのキャリヤタンパク質として作用することができる。

宿主は細菌細胞である。本発明の別の実施態様においては細菌細胞は Escherichia coli 細胞である。本発明の更に別の実施態様においては適当な宿主は真核細胞である。本発明の更に別の実施態様においては、真核細胞は哺乳動物細胞である。本発明の更に別の実施態様においては真核細胞は酵母細胞である。本発明の更に別の実施態様においては適当な宿主は昆虫細胞である。

更に本発明は、T4レセプタの予測される細胞外ドメインで構成されるsT4を生産する手段を提供する。T4 cDNAのT4レセプタのリーダードメイン及び細胞外ドメインをコードする部分、即ち前sT4を使用し、哺乳動物においてsT4を過剰発現(overexpression)できるベクターが構成される。1つのsT4の配列は以下の通りである。

更にT4レセプタが、T4細胞のクラス制限によって示されるような抗原提供細胞におけるMHCクラスⅡ抗原と特異的に会合することを示すデータに基づき、T4のリンパ球-様的細胞相互作用の阻害剤をテストするために、sT4をクラスⅡ抗原と組み合わせて使用することができる。sT4とその標的分子との間の直接結合分析に基づいた上記例に加え、sT4認識に対する生化学的応答に依存するより複雑な分析を行なうことができる。

更に本発明は、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを提供する。本発明の別の実施態様においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+369に融合したアミノ酸配列約+3から約+106を含むポリペプチドをコードする。本発明の更に別の実施態様においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする。

更に本発明は、本発明の発現ベクターを含有する宿主細胞を提供する。本発明の1つの実施態様においては適当な

sT4用コーディング配列は、例えば公知のDNA配列を使用する遺伝子の合成、配列に基づく標準クローニング技術及びタンパク質の探査による再単離、即ちcDNAクローンのT4発現細胞系からのトランスフェクション及びタンパク質に対する抗体による識別により得られる。sT4コーディング配列を担うcDNAクローンはオリゴヌクレオチドハイブリゼーションプローブの使用により識別される。プローブはT4タンパク質の公知の配列に基づき設計されている。sT4コーディング配列を担うクローンを識別したコーディング配列は制限エンドヌクレアーゼを使用して削除され(excised)、クローニング及び/又は発現ベクターに挿入される。発現ベクターでは、sT4コーディング配列はコーディング配列の転写、翻訳及び処理に必要な又は所望される調節機能に効果的に(operatively)結合されている。

調節機能は、例えば転写配列のポリアデニレーション及び増進のような他の機能と同様に、RNAポリメラーゼ結合及び転写に必要な機能を含んでいる。プロモーターは、例えば発現が形質転換クローンの転写及び選択後まで誘発されないように調整し得る。本発明の実施に有効なプロモーターは例えばSV40初期プロモーター及びラウス肉種ウイル

シコホルミシン(oxyecofomycin)耐性)用遺伝子を含んでいる。

哺乳類の細胞での転写及び翻訳の後に、リーダー配列が開裂して現れ、成熟T4がならし培地内に生成される。

本発明の好ましい実施例では、sT4ミニ遺伝子は人間のH-ras又はマウスのジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)のミニ遺伝子に結合されて発現ベクターを作製する。

sT4ミニ遺伝子は、例えば選択マーカー及びこれらの遺伝子とのコートランスクロニングを通じて遺伝子発現を選択的に増幅する手段を提供するために、人間のH-ras又はマウスのDHFRに結合されている。共通の選択マーカーは、例えば同種の遺伝子の單一コピーと同じように少ない組み込みのために選択するDHFR、C418又はハイグロマイシンを含んでいる。例えばDHFR系のメトトレキセート(mx)との増幅の結果、遺伝子が過剰発現する。

遺伝子の増大した発現の代替手段は、rasアロー-腫瘍遺伝子の使用を含んでいる。ras遺伝子科はH-ras、K-ras及びN-ras遺伝子を含んでいる。本発明の好ましい実施例では、H-ras遺伝子を使用する。

他のDNA機能をsT4ミニ遺伝子に直接的に若しくは非直接

ス、モロニー肉種ウイルス又はサイトメガロウイルス(CMV)のロングターミナルリピート(LTR's)を含んでいる。

転写に先立ち、sT4ミニ遺伝子、即ちT4受容体のリーダーと細胞外ドメインとをコードする遺伝子は、遺伝子選択マーカー系を含むより大きいDNA分子内に組み込まれるのが好ましい。選択マーカー系は、トランスフェクトされた宿主細胞内に検知し得る表現型変化を容易に引き起こす任意の遺伝子からなる。かかる表現型の変化は、例えばフォーカス形成又は薬剤耐性であってもよい。このような遺伝子として例えばC418又はハイグロマイシンBに対して耐性の遺伝子がある。又は、キサンチングアニンホスホリボシルトランスクロニーゼ(xprt)、チミジンキナーゼ(TK)及びガラクトキナーゼ(galK)のような他の選択マーカーがある。遺伝子増幅を可能とする選択マーカーは、トランスフェクション効率を増して、又は同種の遺伝子及び選択マーカーの細胞内複製を増進させてコピー数を増大させるために使用され得る。遺伝子のコピー数の増幅にも役立つこのようなマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(メトレキセート耐性)、CAD(N-ホスホンアセチル-レーエスバルテート耐性)及びアデノシンデアミナーゼ(2-デオキ

的に結合することができ、又はこのような機能を結合しないこともできる。Axelの米国特許第4,399,216号を参照のこと。

哺乳類細胞での遺伝子生成物の過剰発現は、一時的な又は安定した手段により行われ得る。一時的な過剰発現は、ワクシニアウイルスベクターの使用のようなウイルス方法又はSV-40複製を支持する細胞内のSV-40ベースのベクターを使用するような遺伝子増幅方法により行うことができる。これらの方法は最終的に細胞の死につながる。安定した過剰発現は、マルチアル遺伝子コピーの世代、例えば遺伝子増幅用選択又はrasアロー-腫瘍遺伝子の使用を通じて行われ得る。

H-ras遺伝子系を使用するコートランスクロニングによるsT4タンパク質の過剰発現は、多くの異なる細胞系を使用して行われ得る。好ましい細胞系は接触阻止したマウスの纖維芽細胞の細胞系であるNIH-3T3細胞系である。他の細胞系は正常ラットの腎臓(NRK)(ATCC 1571)の細胞系及びラットの胚の纖維芽細胞52(REF-52)の細胞系(115)を含んでいる。

選択マーカー系、例えば遺伝子コピー数の増幅が選択的

増幅により行われるメトトレキセートを有するDBFR(DBFR/MTX技術)を使用するとき、中国のハムスターの卵巣の細胞系(CBO)が好ましい。特に、DBFRの欠如したCBO細胞が使用される(116)。使用し得る他の細胞の型は、例えばDHFRになるように変えられた任意の哺乳類の細胞を含んでいる。あるDHFR⁺細胞の型は、メトトレキセートに対して正常DHFR(Axel,米国特許第4,399,216号)ほど感受性のない突然変異DHFR遺伝子と組み合わせて使用し得る。一般に、DBFR⁺細胞は正常DBFR遺伝子及び付加的優性選択可能遺伝子例えばG418耐性用遺伝子(117)を使用し得る。トランスフェクションは標準技術を使用して実施する(118,119)。これらの技術は、例えばリン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストリン誘発ビノサイトシス、エレクトロポレーション及びウイルストラנסフェクションを含んでいる。

トランスフェクションの後に、選択可能な遺伝子の増幅を可能とする条件下で、sT4ミニ遺伝子を担う細胞を普通培地で培養する。標準の哺乳類細胞の培養基、例えばヒボキサンテン及びチミジンがなく10%のウシ胎児血清を含むF12培地(CIBCO,グラントアイランド、ニューヨーク)を使用し得る。細胞培養は30~45°Cの常圧で維持する。選択後

本発明のsT4は、T4の細胞外ドメインの誘導体を含む。そのような誘導体は付加、欠失及び置換を含み、これらの変更はならし培地中へのタンパク質分泌及びタンパク質のHIV envタンパク質即ちgp120への親和性に甚だしい影響を及ぼさない。例えば、1個または数個のアミノ酸をN末端またはC末端に付加し、またはこれらの末端から除去し得る。あるいはまた、1個または数個のアミノ酸、好ましくは4個未満のアミノ酸を内部アミノ酸に插入し、内部アミノ酸から除去し、または内部アミノ酸と置換し得る。他の場合には、sT4とタンパク質キャリヤ、別の抗原または他のsT4分子との間にハイブリッドタンパク質即ち四頭融合体を形成してポリsT4分子を実現することも可能である。更には、sT4はキャリヤ分子に合成的に結合させ得る。

sT4誘導体の一例を後出の実施例に示す(実施例3参照)。sT4のHIV env親和性は、既知の親和性を有するsT4分子を用いるかまたはOKT4及びOKT4AのようなT4レセプターを識別する抗体を用いる競合的結合測定法によって指示することができる。有用な本発明の誘導体sT4分子は、実施例3に示したようにOKT4Aによってならし培地から選択的に析出させることができる。誘導体は発現後化学的に、またはリ

生き残り、また高レベルのsT4タンパク質を発現する細胞は、更に培養を行うために選択される。このような細胞を選択的条件下で培養し、製品であるsT4タンパク質を採取して精製する。

本発明の実施例で使用し得る細胞培養方法は、例えば付着細胞の使用又は浮遊させた細胞の培養を含んでいる。ならし培地(CM)は浮遊させて又は固体支持体に付着させて培養した細胞から採取することができる。即ち、CMは回転瓶で又は固体支持体で成長させ、また浮遊させて又は流動体化した若しくはパックしたベッドで培養した付着細胞から準備する。CMは攪拌したタンク容器の浮遊細胞から準備する。

(以下余白)

ーグー及び/または細胞外ドメインのためのコーディング配列を操作することによって発現前に遺伝学的に製造し得る。

本発明のsT4は使用済み培地から、様々なタンパク質精製技術、例えば親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疏水性クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーを用いて精製し得る。

sT4は通常の基特異的吸着剤、例えば炭水化物結合リガンドまたは染料親和性リガンドを用いるか、またはsT4と特異的に結合するリガンド、例えばモノクローナル抗体またはHIV gp120タンパク質もしくはその一部を用いる親和性クロマトグラフィーで精製できる。

精製は例えば、(1)無血清選択成長培地で細胞を成長させること、(2)ならし培地を澄明にすること、及び(3)本発明のsT4をならし培地中に存在する他のタンパク質から分離することを含む。

好ましい方法において、sT4は無血清培地から、sT4分子の物理特性に基づく一連のクロマトグラフィー操作を用いて精製する。同様のクロマトグラフィー法を用いてsT4を

血清含有培地から精製することも可能である。

sT4精製の好ましい一方法では、初めに培地をイオン交換カラム、好ましくはS-Sepharose[®](スルホプロピルセファローズ)カラムに通し、このカラムはsT4と結合する一方で大部分の汚染タンパク質を通過させる。次いで、線形塩勾配を用いてタンパク質試料を溶離させる。第2のイオン交換カラムを用いる。好ましくはQ-Sepharose[®](第四アミノエチルセファローズ)カラムであるこのカラムは、試料中に存在する汚染タンパク質が該カラムと結合し、一方sT4は結合せず、カラムを貢流緩衝剤から回収されるような特性を有する。最後に、残留汚染物質を除去するべく機能するゲル汎過カラムを用いる。

sT4精製の別の方では、sT4に対するモノクローナル抗体を用いる。sT4に対するモノクローナル抗体と結合する親和性ゲル支持体に澄明にした培地を通すことにより、sT4タンパク質を1操作で精製できる。sT4は抗体結合部位でカラムに結合し、一方汚染タンパク質は絶てカラムを通過する。その後、sT4をカラムから、sT4タンパク質の不活性化を防ぐ条件下に溶離する。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タ

ンパク質との複合体を特異的に形成し得る上述の治療剤のうちのいずれかを製造する方法で、治療剤の製造を可能にする適当条件下に本発明のホストベクター系を成長させること、及び製造した治療剤を回収することを含む方法を提供する。

sT4は、T4タンパク質または該タンパク質と相互に作用する分子を検出する診断測定法に用いることができる。例えば、T4及びT4⁺細胞並びにT4に対する抗体の定量はAIDS治療において価値がある。

sT4はまた新規な診断試薬、例えば標準的な免疫測定法、即ちELISA、捕獲イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ用のMabまたは他の種類の分子の発生に用いることができる。sT4は、OKT4、OKT4A、及びT4レセプターの他の表面エピトープのほとんどかまたは総てを指示するので、系中のT4レベルの絶対的定量に適用できる免疫診断測定法特に有用である。現在、T4レセプター定量のための基準は無い。

T4レセプターは、三つの異なる化学的環境、即ち酸化親水性細胞表面、疎水性膜、及び還元親水性細胞質に存在する。これらの異なる環境がレセプターの、その完全な自然状態での単離を防止すると考えられる。細胞外ドメインの

材料および方法

細胞および抗体

Ficoll Hypaque密度勾配遠心分離によって単離した末梢血白血球はヒツジ赤血球細胞ロゼット陽性(E⁺)細胞に分画した。このE⁺集団内のT4⁺サブセットとT8⁺サブセットを、抗-T8抗体と、アフィニティー精製ウサギ抗マウスIgG(10)に結合したヒト赤血球を用いたT8阻害細胞の属性選択によって単離した。これらのサブセットをサイトフルオロメトリーで分析したところ、T4⁺細胞はT4⁺が95%、T8⁺が2%で、T8⁺細胞はT8⁺が95%、T4⁺が2%であることが示された。

Fro 2.2 Tセルライン(T3⁻、T4⁺、T8⁺、T11⁺)は、未分化型急性白血病の成人患者から得た。JurkatはT3⁻、T4⁺、T8⁺、T11⁺であり、RPMI 8402はT3⁻、T4⁺、T8⁺、T11⁺である。OT-CLLは慢性的リンパ性白血病であり、T3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺である(22)。T4⁺セルラインのCEMとHolt 4はAmerican Type Culture Collectionから入手した。白血病Tセルラインはすべて、5%ウシ胎児血清を含有するRPMI 1640培地で連続的に増殖させた。形質転換したBセルラインCB、CP58およびCP94は既に

(以下余白)

記載されている(23)ようにして得た。

アフィニティー精製したウサギ抗マウス IgG は堿化クロム法(24)によってヒト赤血球に結合した。

L細胞とNIH 3T3 細胞の同時形質転換

ネズミ L tk⁺ apr⁺ 細胞は、10%ウシ血清(Gibco)と50 μg/ mlジアミノブリニ(DAP)を補充したDulbecco変性Eagle培地(DME)中に維持した。L細胞を、形質転換の1日前に10cmの皿毎に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈澱物は、Wiglerら(26)によって改変されたGrahamとvan der Ebの方法(25)により、皿当たり100 ngのDTXと20 μgの高分子量T細胞またはL細胞DNAを用いて調製した。次の日、L細胞を10%ウシ血清、15 μg/mlヒボキサンチン、1 μg/mlアミノブテリンおよび5 μg/mlチミジンを含むDME(HAT培地(27))中で選択下に配置した。tk⁺形質転換体は、12~14日のHAT選択の後ロゼットアッセイを用いてスクリーニングした。

ネズミ NIH 3T3 細胞は、10%新生ウシ血清(Gibco)を補充しDME中に維持した。NIH 3T3 細胞を、形質転換の2日前に10cmの皿毎に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。これらの細胞に、10 μgのキャリヤーDNAならびに10 μgのT4-pMV6tk/

(5×10^6)を適当に希釈したOKT^④4、OKT^④8またはコントロール抗体と共にチューブに入れた。この細胞-抗体混合物を4℃で45分間インキュベートした後cytowashで二回洗った。細胞にフルオレセインイソシアネート(FITC)結合ヤギ抗マウスIgG+A+M(Cappel)を加え、4℃で1時間インキュベートした。次いで、細胞をcytowash中で三回洗い、0.01%ナトリウムアジドを含むPBS 0.5 ml中に再懸濁した。この細胞をBecton Dickinson FACS IVセルソーターで分析し、データをためてVAX 11/780コンピューター(Digital Equipment Co.)を用いてプロットした。

RNAとDNAの単離

細胞を4 Mチオシアン酸グアニジニウム中でホモゲネーションして全RNAを単離した後、5.7 MのCsCl層を通して超遠心した(28)。オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィー(Type 3, Collaborative Research)(29)によってポリ(A)⁺を選択した。Wiglerら(26)により記載されているようにして高分子量のゲノムDNAを調製した。

cDNAおよびゲノムライブラリー

ヒト未梢T細胞から得たポリ(A)⁺RNAから二本鎖

neo または10 μgのT4-pVcos7 および500 ngのpSV2neoを用いてリン酸カルシウム沈澱物を適用した。2日後、これらの細胞を10%ウシ血清と500 μg/mlのG418(Genticin[®], Gibco)を含むDME中で選択下に配置した。選択培地中で1週間増殖させた後生き残るコロニーに対してロゼットアッセイを実施した。

ロゼットアッセイ

プレートをリン酸鈉生理食塩水(PBS)で一回すすいだ後、そのプレートを、5%ウシ胎児血清を含有するPBSに1/500に希釈した精製モノクローナル抗体OKT^④4A(1 μg/ml)2.5 mlと共に室温で45分間インキュベートした。このプレートをPBSで三回穏やかにすすいで遊離の抗体を除いた。精製したウサギ抗マウスIgG抗体に結合したヒト赤血球(2% v/vストック懸濁液、PBS/5%ウシ胎児血清中に1/10に希釈)6 mlを加え、そのプレートを室温に放置した。45分後、ロゼット陽性コロニーの検査に先立って遊離の赤血球を穏やかに吸引し、PBSを加えた。

サイトフルオロメトリー分析

接着性細胞をPBS中の0.005 MのEDTAで取出し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)と0.01%ナトリウムアジド(cytowash)を含有するPBSで一回洗った。0.1 ml中の細胞

のcDNAを合成した(20)。EcoRIメチラーゼとT4DNAポリメラーゼで処理した後、二本鎖のcDNAをEcoRIリンクターを用いてλgt10(30)のEcoRI部位にクローン化した。Charon 4ヒトゲノムライブラリーは、Tom Maniatis博士(Harvard University)(31)から対照として戴いた。

一部を切取ったcDNAアローブの合成

Davisら(32)により記載されているようにして、初期形質転換体LTD-4から得たポリ(A)⁺RNAから³²Pで標識されたcDNAを合成した。このcDNAを過剰の未形質転換し細胞のポリ(A)⁺RNA(ロット-3000)に対してアニーリングした後、ヒトcDNAに富んだ一本鎖の配列をヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー(32)によって単離した。この一部を欠く(subtracted)cDNAアローブをフィルターハイブリダイゼーションにかける前にsec-ブタノールで濃縮し、TEで平衡化したG-50 Sephadexカラムで脱塩した。

cDNAおよびゲノムライブラリーのスクリーニング

ヒト末梢T細胞ライブラリーをE. coli C600/HFL上に播き、ヒトゲノムライブラリーをE. coli LE392上に播いた。ふたつ(duplicate)のフィルターを標準法(33)に従ってスクリーニングした。この際、ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド

および $5 \times SSC$ 中で 42°C で行なった。この cDNA ライブラーのスクリーニングにおいて、 $137 \mu\text{g}$ ニトロセルロースフィルター当たり $6 \times 10^4 \text{ cpm}$ の一部を欠くプローブを適用した。ゲノムライブラーから得たフィルターをニック翻訳した(34) cDNA 対応物にハイブリダイズした。 68°C で洗浄し、最後に $0.2 \times SSC$ で洗浄した。増感スクリーンを存在させて -70°C で 1~2 日オートラジオグラフィーにかけた。

DNA 配列決定

DT4B の制限断片を M13ベクター λ p18 および λ p19(35) 中にサブクローニ化した。配列決定反応はジデオキシチエインターミネーション法(36)を用いて行なった。配列決定の方策 (strategy) を第 3 図に示す。

Southern および Northern プロットハイブリダイゼーション

高分子量の細胞 DNA を、製造業者 (Boehringer Mannheim) の推奨するところに従って DNA 1 μg 当たり 5 単位の制限ヌクレアーゼで消化した。サンプル ($10 \mu\text{g}$) を 0.8 % アガロースゲル上で電気泳動にかけた。DNA 断片を Gene Screen (New England Nuclear) (37) に移し、Church と Gilbert(38) により記載されているようにしてハイブリダイズした。

RNA を 0.8 % アガロース - ホルムアルデヒドゲル (39) 上に

渡し、GeneScreen に移した。Northern ハイブリダイゼーションは製造業者の提供する手順に従って実施した。Southern プロットも Northern プロットもニック翻訳したプローブにハイブリダイズした。

SP6 RNA の合成および In Vitro 翻訳

kb の T4 cDNA を pSP6S (Promega Biotech) の EcoRI 部位にサブクローニ化し、HindIII で線状化した。放射標識したヌクレオチドを存在させずに SP6 ポリメラーゼを用いた線状化したプラスミド DNA (1 μg) を転写するには既に記載(40) の通りにしたが、転写バッファーには GpppG と未標識の CTP を添加した。反応混合物の 1/10 を、L - [^{32}S] - メチオニン (Amersham) と 1 μg の S - アデノシルメチオニンを含有する麥芽系 (Bethesda Research Laboratories) で翻訳した。この in vitro 翻訳産物を下記の還元条件下で SDS - ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。

細胞培養、レクチンクロマトグラフィーおよび免疫沈降

既に記載(41)されているようにして、10% の透析したウシ血清と 1 μCi の L - [^{32}S] - メチオニン (Amersham) を含有しメチオニンを含まない DME 培地中で 12 時間細胞を増殖させた。この細胞を、0.5 % Nonidet P-40 (Shell) および 0.2 mM フェニ

ルメチルスルホニルフルオライド (Sigma) を含有する 10 mM の Tris (pH 7.4)、150 mM の NaCl (TBS) 中に可溶化した。溶解物を $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し、上清を Hedoら (42) の手順に従ってレンズ豆レクチンクロマトグラフィー (Pharmacia) にかけた。溶離液を、コントロールのマウス腹水およびアロテイン A - セファローズ (Pharmacia) の混合物を用いて一回 4 度で 1 時間、そしてプロテイン A - セファローズだけを用いて二回 4 度で 1 時間予偏吸着させた。次に、各上清のうち $2.5 \times 10^4 \text{ cpm}$ を 10 μg のモノクローナル抗体 (約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびアロテイン A - セファローズと混合し、ターンテーブル上で 4 度で一晩インキュベートした。次いで、ビーズを 0.5 % の NP-40 と 0.2 % の SDS を含有する冷 TBS で四回洗い、電気泳動サンプルバッファー中に再度懸滴した。

ゲル電気泳動

SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli (43) の手順に従って実施した。免疫沈降物と in vitro 翻訳産物を 2-メルカプトエタノールを含むかまたは含まないサンプルバッファー中に浴かした後、10% ポリアクリルアミドゲルにかけた。オートラジオグラフィーは、増感スクリーン (DuPont Chemical Company) の存在下で Kodak XAR-5 フィルムを用いて行なった。

同時形質転換およびロゼットアッセイ

マウス ϕ -2 細胞 (44) は、10% ウシ血清 (CS) (Gibco) を補充した Dulbecco の変性 Eagle 培地 (DME) 中に維持した。 ϕ -2 細胞は、形質転換の 2 日前に 10 cm の皿当たり 5×10^5 の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈殿物は、Wigler ら (27) によって改変された Graham と van der Eb の方法 (25) によって調製した。10 μg のキャリヤー-DNA および 10 μg の T4-pHVT または 10 μg の T8-pHVT を用いて沈殿物を細胞に適用した。2 日後、これらの細胞を DME / 10% CS と 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 (Geneticin[®], Gibco) 中で選択下に配置した。

T_4^+ 又は T_8^+ コロニーを同定するための Rosetting アッセイは、特定培地中での生育から 1 週間後生存コロニーを実施した。リン酸緩衝食塩液 (PBS) を用いて 1 回リシスした後、プレートを 5% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 PBS 中で 1/500 希釈した精製モノクローナル抗体 OKT^① 4A 又は OKT^② 8 (1 mg/ml; Ortho) 2.5 ml と一緒に室温で 45 分間インキュベートした。プレートを PBS 中で 3 回やさしくリンスして、遊離の抗体を除去した。精製ウサギ抗マウス IgG 抗体 (2% v/v ストック懸濁液、PBS/5% FCS 中で 1/10 希釈) を接合したヒト赤血球を添加し、プレートを室温で放置した。45 分後、遊離の赤血球をゆっくり吸引し、検査の前に PBS を添加した。 T_4^+ 及び T_8^+ ϕ -2 クローンをコロニー単離により精製し、その特性をフローサイトメトリー及びノーザンプロット分析により調べた。

組換えレトロウィルスの产生及び感染

10^5 cfu/ml の力値を有する組換えレトロウィルスストックを产生する T_4^+ 及び T_8^+ ϕ -2 クローンを単離した。ウィルスストックを、 T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -2 クローンの近融合性 (near confluent) 単層に新鮮な DME/10% CS 10ml を添加

して作成した。24 時間後、培地を取り除き、0.45 μm フィルター (Millipore) を用いて通過した。感染のために、 5×10^5 細胞を、8 μg/ml polybrene (Aldrich) の存在下でウィルス上清 (又は希釈液) 2 ml と一緒にインキュベートした。3 時間後、新鮮な培地 3 ml を添加した。感染から 3 日後、細胞を 500 μg/ml G418 含有 DME/10% CS に再接種し、2 週間生育させ、G418⁺ コロニーを計数し、In situ rosetting 法又はフローサイトメトリーを用いて表面 T_4 又は T_8 発現について調べた。

ϕ -2 培養上清を用いて、上記したマウス ϕ -AM 細胞を感染した。 T_4^+ 又は T_8^+ 粘着トランスフォーマントを、In situ rosetting アッセイ後コロニー単離により精製した。

T_4^+ 又は T_8^+ 非粘着性トランスフォーマントを、フルオレスセンス励起セルソーティング (FACS) により精製した。非粘着性ヒトリンパ球細胞系 (HSB2, RPMI-T 細胞, Raji-B 細胞) 及び粘着性上皮細胞 (HeLa) を、 T_4^+ 又は T_8^+ ϕ -AM クローン (10 μg/ml マイトマイシン-C で 2 時間予偏処理、Sigma) と共に培養して感染させ、精製した。細胞系を 1.5 mg/ml の濃度での G418 耐性について選択した。

但し、HeLa 細胞では 1 mg/ml、腺癌細胞については 0.5 mg/ml とした。組換え両性ウィルス (4-AM) を产生する全ての細胞培養物を P3 拘束条件下で保持した。

AIDS ウィルス

HTLV-III/LAV のプロトタイプ LAV 閻株を J.-C. Cherman (Institut Pasteur, Paris; (45)) から入手した。本研究で使用したウィルス接種物は、我々の実験室の第 2 ~ 第 5 代ウィルス由来のものであった。接種物は、HTLV-III/LAV - 感染植物性血球凝集素 (PHA) - 刺激末梢白血球 [逐次遠心 (300 × g) で 7 分間実施した後 1500 × g で 20 分間実施により集めた] の培養上清であり、液体窒素中で保存した。結合研究のために、ウィルスを、上記の如く 90,000 × g で 90 分間の超遠心により集めた培養上清から 0.01M Tris, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 中の Renograffin (E.R. Squibb) 15% クッションを用いて濃縮した。

抗-HTLV-III/LAV 試薬

HTLV-III/LAV に対する抗体を多く含む血清を慢性リンパ節疾患を患っているホモの男性から得、蛍光抗体法 (46)、ウェスタンプロット分析 (47) 及び放射免疫沈降 (48) によりその

特異性を調べた。IgG 分画の一部を、上記した如く (47, 49, 50, 51) フルオレセインイソチオシアネート (FITC; FITC: たんぱく質比 = 10.7 μg/ml)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HPO、タイプ VI, Sigma) 及びアガロースとカッピングさせた。非免疫血清からの IgG 接合体も平行して作成した。

逆トランスクリプターゼアッセイ

Mg 依存の粒子逆トランスクリプターゼ (RT) 活性を、7.5 mM Mg²⁺ (52) の存在下で (A)_n (dT)₁₂₋₁₈ [負のコントロールとして ()_n (dT)₁₂₋₁₈] の錫型プライマーを用いて測定した。

細胞質 AIDS ウィルスのけい光抗体検出

培養細胞 (0.1 ml 中 1×10^5) をガラススライド上で遠心 (Shandon cytocentrifuge)、95% エタノール - 5% 酢酸中 - 20°C で 30 分間固定し、PBS (0.01M PO₄, 0.15M NaCl, pH 8.0) を用いて 10 分間 3 回再水和した。スライドを FITC - 抗 HTLV-III/LAV の 1/500 希釈液 (19 μg/ml) に室温で 30 分間露した。次いで、スライドを洗浄し (10 分間 × 3)、PBS 中 50% グリセロールを用いてカバース

リップの下に載置した。630 × パワーの落射照明のLaitz orthoplan 顕微鏡で、スライドを検査した。これらの条件下で、F I T C - 抗 H T L V - III / L A V 試薬は H T L V - III / L A V に対して特異である。非感染の P H A 刺激細胞、Epstein Barr (E B) ウィルス感染 B 細胞系、アデノウィルス - 感染細胞系、T 細胞系並びに H T L V - I 及び H T L V - II 感染細胞系は染色されなかった。

D AIDS ウィルスイムノアッセイ (抗原捕捉アッセイ)

感染 H T L V - III / L A V の力価測定のための微小培養アッセイは(47)に詳記されている。概略的には、P H A - 刺激リンパ球又は細胞系 (2×10^6 細胞 / ml) をウィルス接種物の連続10倍稀釈により接種し、37°Cで18時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、微小培養物 (稀釈あたり10~20カルチャ : 0.25ml 培地中のカルチャあたり 1×10^5 細胞) 中にプレートした。4日毎に、上清100 μlを取り除き、新鮮な培地と取り換えた。次いで、上清を、上記した如き抗原捕捉アッセイによりウィルス抗原についてアッセイした。感染ウィルス価 (I D - 50) は、培養物の50%がウィルスに対して陽性を示す希釈のレシプロカルとして定義される。

V S V シュードタイプアッセイ

水泡性口炎ウィルス (V S V, Indiana 国株、野生型) を、上記した如く(53)エンベロープシュードタイプに必要なレトロウイルスを産生する細胞中で増殖させた。高度免疫の中性化抗体 - V S V 血清を集めた V S V に添加して、非シュードタイプウイルス粒子を不活化した。シュードタイプ価は 10^4 ~ 10^5 P F U / ml の範囲であった。アッセイのために、V S V シュードタイプで感染させるべき 2×10^5 細胞を直径30mmの組織培養ウェルに導入した。HeLa, NIH 3T3 及びし細胞は本来粘着性であり、他のタイプの細胞は下層を $50 \mu g / ml$ のポリーリーリンを用いて予処理することにより付着した。1時間ウイルスを吸着させた後細胞を洗浄し、各ウェルに 10^6 ミング CCL 64又は牛MDSK 細胞を添加した。これらの細胞は二次 V S V 感染のための優れたブラークを提供するが、シュードタイプビリオンによる感染に対しては耐性を有している。ブラーク指示細胞を固定、拡散させた後 (約90分)、单層を寒天培地で覆った。感染後2日目に、V S V ブラークをカウントした。抗-T₄ A モノクローナル抗体 (1 : 20)、抗-H T L V - III 血清 (1 : 10) 又は抗-H T L V - I 血清 (1 : 10) を使用し、

(54)に記載されている如く細胞を予処理してから30分後シュードタイプを添加することによりシュードタイプブラークの形成を抑制した。

シンシチウム誘発アッセイ

2×10^5 細胞を、直径10mmのウェルにおいて H T L V - III (55)により感染かつ H T L V - III を産生する 2×10^4 H 9 細胞と一緒に共培養した。培養物を37°Cでインキュベートし、前記した如く(54, 56) 18時間後にシンシチウム形成について調べた。5個もしくはそれ以上のシンシチウムを含む細胞を正と判定した。接種時に混合培養物に抗-T₄ A モノクローナル抗体 (1 : 20) を添加してシンシチウム抑制を調べた。

細胞けい光分析及びAIDS ウィルス結合

方法は(46)に詳説されている。概略的には、フルオレセンス接合抗-T₄ A 又は抗-T₈ A モノクローナル抗体 (OKT[®] 4 A, OKT[®] 8) を用いる直接けい光抗体法により、細胞表面 T₄ 又は T₈ 発現を検出した。希釈 / 洗浄バッファは、0.1%牛血清アルブミン、2% v/v A B⁺ ヒト血清及び0.01% Na₃N₃ を含む0.01M PO₄, 0.15M NaCl, pH7.4 であった。全ての試薬を最適 (飽和) 結合のために予備滴定した。細胞

(5×10^5) をモノクローナル抗体希釈物25 μl 中4°Cで30分間インキュベートした。細胞を遠心 (300 × g で7分間) により洗浄し、食塩液中1%バラホルムアルデヒド0.5 ml中に再懸濁し、フルオレセンス励起セルソータ (F A C S IV, Becton Dickinson) を用いて分析した。H T L V - III / L A V 結合のために、 5×10^5 細胞を H T L V - III / L A V (10 μl 中50ng) を一緒に37°Cで30分間インキュベートした。洗浄した細胞をフルオレセンス接合抗-H T L V - III / L A V 25 μl 中に4°Cで30分間再懸濁させた。細胞を洗浄し、1%バラホルムアルデヒド中に再懸濁し、上記した如くF A C S についてアッセイした。H T L V - III / L A V 結合の抑制のために、細胞を抗-T₄ A 又は T₈ (20 μl 中20 ng) と一緒に4°Cで30分間予備インキュベートした後 H T L V - III / L A V (10 μl 中500ng) を37°Cで30分間に亘り添加した。細胞を洗浄し、フルオレセンス接合抗-H T L V - III / L A V と一緒にインキュベートし、洗浄し、バラホルムアルデヒドに再懸濁し、上記した如くF A C S について分析した。

細胞表面の放射性ヨウ素化、免疫沈降及びゲル電気泳動

T₄ + NIH 3T3 トランスマントの表面を、ラクト

ペルオキシダーゼ法(18)により放射性ヨウ素化した(radio iodinated)。 4×10^7 細胞を0.5mM EDTA、2mCi Na¹²⁵I及び20μgのラクトペルオキシダーゼを含むPBS 1ml中に懸濁した。0, 1, 5, 10及び15分目に0.03% H₂O₂ 10μlを添加した。反応を23°Cで実施し、10 mM NaIを含む冷PBS 50容量中で2回遠心することにより20分目に反応を停止させた。標識細胞を4本のチューブに分け、HTLV-III/LAV (20μl 中 2μg) と一緒に37°Cで30分間インキュベートした。続いて、0~4°Cで洗浄し、検査した。洗浄した細胞を、洗浄溶解バッファ (LB; 0.2mM フェニルエチルスルホニルフルオライド、5μg/ml アブロチニン、0.02mM フェニルエチルスルホニルフルオライド、ラムノースアセチルテロゾン 0.2mM EGTA、0.2mM NaF、0.2% デオキシコール酸ナトリウム及び0.5% (v/v) Nonidet P-40含有0.02M Tris、0.12M NaCl、pH8.0) 1mlを添加して溶解させた。チューブを氷上で15分間保持し、3000×gで20分間遠心して核を除去した。

吸収処理用に、ヒト抗HTLV-III/LAV IgG、ヒト非免疫 IgG、抗T₄A及び抗T₈抗体のセファロース結合物

(conjugate)を既述のようにして調製した(48)。分解物(Lysate)を搅拌下1.5時間、200μlのセファロース-非免疫ヒトIgGに予備吸収させたのち、搅拌下3時間で20μlのセファロース結合物(上記のもの)を用いて免疫沈出させた。セファロース吸収物を、LBで1回、0.5 M NaClを含むLBで1回、そして0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むLBで1回の合計3回洗浄した。吸収物質を65°Cにて30分間、20μlのサンブルバッファー (0.01M Tris、pH8.0; 2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール(v/v)、25μgのプロモフェノールブルー及び10%のグリセリン(v/v)を含有)により溶解した。電気泳動は、3.3~20%のグラジェントの、3%の結合ゲルを含むポリアクリラミドゲルで行ない、オートラジオグラフはコダックXAR-5フィルムを用いて現像した。

ウィルス阻害アッセイ

2×10^5 T₄⁺ JM T細胞を0分にエイズウィルスに暴露した。阻害剤である塩化アンモニウム(20 mM)又はアマンタディン(amantadine)(20 mM)を、ウィルス感染の種々の時間に(0分、30分、及び60分)加えた。6時間後、細胞を洗浄し、

新鮮な媒質(RPMI/10% FCS)で置換した。エイズ感染におけるこれらの試剤の作用を感染5日後に評価した。ウィルス抗原を発現する培養物中の感染細胞のフラクションを、上記のように免疫ケイ光分析法によって測定した(58)。

RNA単離及びノーザンプロットハイブリダイゼーション

全RNAを細胞から、4Mのグアニジンチオシアネットにホモジナイズし、その後5.7 M CaCl₂クレッショングリセリンを介して超遠心して単離した(28)。ポリ(A)⁺セレクションは、オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィー(タイプ3、コラボレーティブリサーチ(Collaborative Research))によって行なった(29)。RNAを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲル(39)上で電気泳動し、ハイポンド(Amersham)上に移した。ノーザンプロットハイブリダイゼーションを製造者からもたらされた方法に従って行なった。プローブを $\alpha^{32}P$ ラベルデオキシヌクレオチドトリホスフェートで比活性 $0.5 \sim 1 \times 10^9$ cpm/微生物にニックートランスレート(nick translate)した(59)。

結果

T₄cDNAの単離

T₄cDNAの単離に用いたストラテジーは、その表面で

T₄を発現するL細胞形質転換体を構築することを最初に含む。T₄⁺形質転換フィプロラスト(腺維芽細胞)のmRNAから合成されたcDNAを消去的ハイブリダイゼーションにより濃縮し、外縁のTリンホサイトのmRNAから作られたcDNAライブラリーからT₄をコードするcDNAを単離するためのプローブとして用いた。T₄⁺cDNAクローンの同一性は、ノーザン及びサザンプロット分析法により、そして究極的にはこれらのクローンがT₄⁺フェノタイプをレシピエント細胞に移す能力により決定した。同様の手法は、先に、T₈タンパクをコードしている遺伝子を単離するために用いられている(20)。チミジンキナーゼ(tk)欠損マウスL細胞を、tkを含むプラスミド、pTK(25, 26)に沿ってT細胞白血病セルライシHUT-102からゲノムDNAと共に形質転換(cotransform)した。T細胞の表面タンパクを発現するtk⁺L細胞形質転換体は、系内でのロゼッティング(rosetting)分析により同定した。tk⁺クローンをT₄に対するマウスモノクローナル抗体に暴露し、その後ウサギ抗マウス免疫グロブリンとカップルした赤血球と共にインキュベートした。T₄形質転換形は、赤血球との特異的な結合により、赤色を呈した。このようにして、

1つの一次 T_4^+ 形質転換体、LTD-4を得た。このクローンによる T_4 分子の発現は、サイトフルオロメトリック (cytofluorometric) 分析により、独立に変化した (第1図)。 T_4^+ 形質転換体、LTD-4のmRNA分布は、新たに形質転換された遺伝子の発現においてのみ、非形質転換L細胞のそれと異なるはずである。これらのシーケンスは、非形質L細胞 (32, 60) からの大過剰のRNAと共に T_4^+ 形質転換体のポリ(A)⁺ RNAから調製された高度にラジオアクティブなcDNAをアニールすることにより濃縮される。高ロット(Rot)値においてすらハイブリダイズできないcDNAをヒドロキシアバタイトクロマトグラフィーにより単離し、lambdaクローニングベクターgt10中で構築されるヒト外縁T細胞cDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いた。4つの弱いハイブリダイズブラーク(hybridizing plaque)が同定され、ブラーク精製され、 T_4 シーケンスの存在について分析された。

これらのクローンのどれが T_4 をコードするか決定するために、 T_4^+ と T_4^- 外縁(peripheral) T細胞、白血病細胞、胸腺細胞、L細胞形質転換体及び非リンホイド(nonlymphoid)細胞を用いて、ノーザンプロット分析を最初に行なった (第2

図)。4つのクローンのうち1つは、 T_4^+ 細胞中にのみ存在するRNAにハイブリダイズした。このクローンは T_4^+ 形質転換体、LTD-4中に存在する3kbRNAを検知し、また、 T_4^+ 外縁リンホサイト、多種の T_4^+ 白血病セルライン、及び胸腺細胞のポビュレーション中に存在する。非形質転換フィプロblast、 T_4^- 外縁リンパ細胞、HeLa細胞、あるいはヒトニューロblastoma(neuroblastoma)細胞からのRNAではハイブリダイゼーションは認められなかった。

このクローンにより検知されるRNAの発現パターンは、それが T_4 をコードしている可能性と一致する。しかしながら、このcDNAは単に0.6kbの長さであり、3kb mRNAにハイブリダイズする。従って、ヒト外縁T細胞cDNAライブラリーを再スクリーニングし、3kbインサートを含む1つのクローン(pT4B)が得られ、このものはサイズ的に成熟した(mature) メッセンジャーRNAに近似していた。このクローンの制限地図(restriction map)を第3A図及び第3B図に示す。

ゲノムプロット分析

ノーザンプロット実験(37)を次に行ない、単離したcDNAク

ローンがヒトDNAと同様に T_4^+ 形質転換体からのDNAとハイブリダイズし、非形質転換マウスマルコモ細胞DNAとはハイブリダイズしないことを明らかにした (第4図)。種々のヒト細胞からのゲノムDNAは、BamH I酵素での開裂の後、5つのハイブリダイズしたフラグメント群を示す。予期されたように、 T_4 シーケンスが形質転換体、LTD-4中に検出することができるが、非形質転換L細胞DNA中には検出できない。遺伝子(6.6kb)の3'末端に最も近いBamH IフラグメントはLTD-4中に存在せず、恐らくインテグレーションインベントの結果と思われる。さらに、リンパ様及び非リンパ様細胞からのDNAと比較すると、このような粗い分析レベルでは、全体の再配列は明らかではない。ハイブリダイズしたフラグメントの分子量の合計は33kbであり、 T_4 遺伝子が大層大きいことを示唆している。この領域をスパンするゲノムクローンの完全なセットが得られ(下記参照)、BamH Iフラグメントはこれらのクローンの制限分析によって秩序化され、遺伝子が大きかつかなりの長さのインtronを含むに違いないことが確かめられた。

形質転換マウスマルコモ細胞での T_4 cDNAの発現

単離したcDNAが T_4 をコードすることは、さらにこのクローンが形質転換の後、脾細胞を T_4^+ フェノタイプに変換しうるかどうかによって実証される。染色体DNA中の T_4 遺伝子は大きく、さらにいくつかのゲノムクローンにスパン(span)する。従って、cDNAクローンを2つのレトロウィルス発現ベクター、pVcos 7およびpMV6tk/neoに導入する。これらのベクターは、単一のEcoR Iクローニング部位の側にあるモロニーマウスマルコモ白血病ウィルスの長い末端リピート(LTRs)を含んでいる。5'-LTRはクローニング部位を通しての転写を促進し、3'-LTRは開裂及びポリアデニレーションに必要なシーケンスを含む。ベクター pMV6tk/neo はまた、ネオマイシンホスフォランスフェラーゼ遺伝子のコード領域に融合したtkプロモーターを含んでいる。

pVcos 7を用いる構築物(construct)は非結合選択可能マークーと共に形質転換することを必要とする。一方、pMV6tk/neo は、結合(linked)共形質転換を許容するネオマイシン耐性マークーを有する。形質転換後得られるNIH3T3細胞のNeo⁺コロニーを、ネオマイシン類縁体G418を含む媒質中で成育する能力によって選択し、細胞表面での T_4 の発現を検

出するロゼッティング法を用いてスクリーニングした。

pVcos 7で得られたG418コロニーの約50%及びpMV6tk/neoで得られたコロニーの75%がこのアッセイでT₄について陽性であった。ロゼット陽性コロニーをさらにサイトフルオメトリーで分析して、T₄が形質転換細胞の表面で発現されていることを確認した(第1図)。

代謝タングラベル実験を行ない、T₄⁺形質転換膜維芽細胞及びTリンパ細胞が同一の分子量のT₄タンパクを発現することを明らかにした。非形質転換NIH3T3細胞、T₄⁺形質転換体及びTリンパ細胞をL-[³⁵S]-メチオニンの存在下に12時間ラベルした(41)。これらの細胞を洗剤で可溶化し、溶解物(lysate)をレンズ豆レクチンカラムに通して糖タンパクを濃縮した(42)。結合糖タンパクフラクションを溶離し、T₄に対するモノクローナル抗体で免疫沈降(immunoprecipitate)させた(第5図)。還元条件下、相対分子量55kdで泳動する糖タンパクを、Tリンパ細胞と2つの独立したT₄⁺形質転換体からの抽出物中で検出する。このタンパクはコントロールである3T3膜維芽細胞中では検出されない。非還元条件下では、51kd糖タンパクが、T細胞中及び形質転換膜維芽細胞中で抗

T₄により免疫沈降される。

これらの実験から、形質転換体が抗T₄により免疫沈降される55kd糖タンパクを発現し、このものはサイズ的にTリンパ細胞の表面で発現されるものと同一であることが明らかとなった。従って、単離cDNAを用いるノーザン及びサザン分析、さらにはT₄⁺フェノタイプをマウス腎膜維芽細胞に付与するこのcDNAの能力の両者の結果は、T細胞表面タンパクT₄の全てのコードシーケンスがクローニングされたことを示している。

T₄cDNAのヌクレオチド及び推定タンパクシーケンス

T₄コード領域の完全ヌクレオチドシーケンスを、ジエオキシ終止法(termination method)を用いて、3kbcDNAインサート両方のストランドをシーケンシングすることにより決定した(35, 36)。完全ヌクレオチドシーケンス及び予測タンパクシーケンスを第6図に示す。最長のオープン読み取りフレームは、開始コンセンサスシーケンス PurNNATG P urによって取り囲まれたメチオニンコドンを有する部位76から始まる(61)。この読み取りフレーム(reading frame)は1374ヌクレオチドに及び、458アミノ酸を含むポリペプチドをコードして

いる。この読み取りフレームの広がりは、このcDNAをRNA発現ベクターpSP69にインサートすることにより確認した(47)。このベクターから合成したRNAは、生体外で翻訳された場合、非修飾(unmodified) 51kdタンパク(ヌクレオチドシーケンスから予測された正確な分子量)の合成を支配する(第7図)。

(以下余白)

T₄は、リーダー配列、4つの tandem 可変-結合(VJ)様領域、及び膜伸展領域から成り、各部分はイムノグロブリン遺伝子族(62, 63)の異なる構成メンバーとの対応する領域と相同性を有している(第6及び8図参照)。Kyte-Dolittle(64)疎水性プロットにより予測されるリーダーペプチドに対応する疎水性残基の一連(Stretch)は、開始コドンの直後に位置している。天然T₄タンパクがプロセス処理される正確な位置は決定することができないが、既知の開裂パターン(65)に基づくと-1位置のスレオニンの直後で開裂が生起するものと考えられる。従って、シグナルペプチドは23個のアミノ酸を含有しており、プロセス処理されたT₄は435個の残基から成るタンパクである。

成熟タンパクの1-94残基部分は、イムノグロブリンのL鎖可変領域とアミノ酸及び構造上の相同性を有している(第9A図)。該イムノグロブリン可変領域とこの領域との全体の相同性は32%になる。イムノグロブリンL鎖のV領域とT₄のN末端V様領域(V1)との配列の比較から、不变残基14のうちの8残基が保存されていることが判る(66)。この領域には、2つのシティン残基があり、67コのアミノ酸残基分離れており、この位

置と距離はイムノグロブリンL鎖及び関連分子に見出される対応部分に類似している(67)。これらのシステインはV領域に特徴的な保存されている鎖間のジスルフィド結合を形成することができる。この予想は、還元条件下よりも非還元条件下の方が T_4 の移動速度が大きいこと、これは少なくとも1つの鎖間結合が形成されていることを意味する、という我々の観察結果によって、支持されるものである(第5図、レーンe及びf)。

個々のアミノ酸レベルに於る相同意外にも、 T_4 のV1領域はイムノグロブリン可変領域と構造的な特徴を共有するものである。イムノグロブリンの可変及び不变領域は、連続する平行 β -鎖が折りたたまれて2つの β -シートを形成するという特徴的なパターンで折りたたみこまれている(67,68)。これらの β -シートは、ジスルフィド結合及び特徴的な疎水性相互作用の両者によって、一塊になっている。 T_4 のV様領域がイムノグロブリンL鎖のV領域と2次構造上でどのような相間を有しているかを決定するために、二次元構造アライメントを行った。同様に、これらの配列における予想可能な β -鎖及び β -ターンのプロットもChou及びFasmanの経験的に誘導されたアルゴリズムを用いて行った。これらの分析によって、 T_4 のV

様領域内に存在する7つの β 鎖の存在はイムノグロブリンV領域内に見出される対応領域と非常に良く一致していることが判る。第9A図参照。 T_4 の保存された2つのシステインはB鎖B及びF内にあり、イムノグロブリンの保存ジスルフィド結合を形成することが知られているV領域内のシステインの位置と正確に合致する。第1のシステインの12個アミノ酸分下流にトリプトファンがあり、第2のシステインの2個アミノ酸分前にはチロシンが位置する。これらの残基は、L鎖V領域のB鎖C及びFに夫々非常に特徴的なものである。更に、アスパルテート残基が第2のシステインの6個アミノ酸分上流にあり、アルギニン残基はB鎖Dのベースに位置する。これらの荷電残基はV領域に非常に特異的なものである。最後に、疎水性残基がB鎖をつうじて交互に存在しており、これによって、二つの β -シートの相互作用が強化される。

T_4 のV1領域の後には、イムノグロブリンの結合(J)領域及びTセル抗原レセプターと顕著な相同意有するアミノ酸残基が続いている。第9B図において、この T_4 J様領域はイムノグロブリンのL鎖のコンセンサスJ配列及びTセル抗原レセプターの二つの鎖と整列させて記載してある。このJ様領域に

統いて、統計的に重要な配列であってイムノグロブリンVJ領域のポリペプチドに構造的相同意有する、三つの付加VJ様領域に構造的に分けることができる265個のアミノ酸配列がある。第6及び8図参照。更に、この領域には、N-結合型グリコシル化部位が二つ存在する可能性がある(A sn-L eu-Thr; 第6図)。

細胞外領域に統いて、疎水性プロット(64)による予測で可能性的ある膜透過(膜通過)配列があり、この配列は、疎水性及び中性アミノ酸残基のみを含むものである。このセグメントは、II型主要組織適合抗原タンパクのB鎖の膜通過エクソンと極めて相同意が高い(第9C図)。これらの配列をならべて比較すると、ギャップなしに48%の相同意が認められる。この膜通過セグメントに統いて、40個の高荷電性アミノが細胞質領域を構成する(第6及び8図)。

T_4 遺伝子: 染色体位置及びインtron-エクソン位置

T_4 cDNAを用いて、そのマウス-ヒト細胞ハイブリッドのパネルにおける凝集パターン及びヒトメタフェーズ染色体とのin situハイブリダイゼーションによって、 T_4 遺伝子の染色体上における位置を分析した(101)。遺伝子プロット及び

in situハイブリダイゼーションによって、 T_4 遺伝子がヒト染色体12の短腕、12p12及び12pterの間にあることが判明した。

T_4 遺伝子を有する重複ゲノムクローニング組を、ラムダクローニングベクターcharon1及びEMBL B-3(31)内に構築されたヒトゲノムライブラリーをラジオ化p T_4 B-cDNA挿入物でスクリーニングすることによって得た(70)。これらのクローニングの特徴は、制限酵素及びサザンプロット分析によって明らかにされ、全 T_4 コード領域が含有されていることが判明した。ジテオキシ停止法を用いて、ゲノムクローニングの特異的フラグメントを配列決定することによって、 T_4 遺伝子の完全なインtronエクソン構造が決定された(35,36)。

第8及び10図に示したように、 T_4 遺伝子は、8つのインtronによって分割された9つのエクソンから成る。第1のエクソンは5' 非翻訳領域及びリーダーセグメントを含む。第1番目のV様領域 V_1 は残基289に位置する大きなインtronによって分離されている(第6図)。従って、 V_1 J1領域は、第2及び第3番目のエクソンにコードされており、 V_2 J2、 V_3 J3、 V_4 J4及び膜通過(TM)領域は、それぞれ別のエクソンにコードされている(エクソン4-7)。細胞質領域

(C Y T) は、イントロンによって分断され、この領域の最後の部分は 3' 非翻訳領域とともに第 9 番目のエクソンにコードされている。

T_4^+ 及び T_8^+ 形質転換細胞の構築

AIDS ウィルス感染における T_4 の役割に関する研究において、最初に用いられた実験手法は、ウィルス感染を助けることのできない T_4^- 細胞系内に T_4 遺伝子を導入することから成る。こうして得られた形質転換細胞は AIDS ウィルスに対する感受性について試験し、次いで、 T_4 がウィルス感染を媒介するメカニズムについて研究した。

T_4 の表面抗原をコードする全長 cDNA クローンをレトロウィルス発現ベクター、pMV7 にサブクローン化した。発現ベクター pMV7 (第 11A 図) は、単一 EcoRI クローニング部位を端に有する二つの直接に反復される、モロニーネズミサルコマウィルスのLTR (long terminal repeat) を含有している。5' - LTR はクローニング部位をつうじて構成的 (constitutively) に転写を促進し、一方、3' - LTR は RNA の切断及びポリアデニル化に必要な配列である。更に、pMV7 には、細菌ネオマイシンホストランスクレオチダーゼ遺

伝子 (neo) のコード領域に融合したヘルペスウィルスチミジンキナーゼプロモーター (tk) 、ドミナント選択マーカーが含まれており、共形質転換及び感染をリンクさせておこなうこと可能にしている。

T_4^- pMV7 は、夫々、欠損自己指向性及び両指向性 (anphotropic) プロウィルスを含む (44,45) 、 ϕ -2 及び ϕ -AM 細胞、及び NIH 3T3 細胞系に導入された。第 11B 図参照。両細胞系は、内因性ウィルス RNA のキャプシダ化 (encapsidating) を起こさせることは出来なかったが、真正の全てのトランスクレオチダーゼ機能を提供し得た。 T_4^- pMV7 によるこれら細胞系の安定した形質導入 (トランスクレオチダーゼ) によって、ヘルバーウィルスフリーの T_4 をコードする組換レトロウィルスストックの生産が生起された。これら純粋なウィルスストックは、次いで、マウス及びヒト細胞に、レトロウィルスの様の細胞による生産なしに、 T_4 配列を効率的に導入するために使用された。

簡単に述べると、DNA - 媒介遺伝子移入操作を用いて T_4^- pMV7 DNA を ϕ -2 細胞内に導入した (第 11B 図、25, 27) 。ネオマイシンアログ G418 (Geneticin) を含む培地中

で増殖し得る能力を有する Neo^r 隆性コロニーを選択し、in situ ロゼット形成アッセイを用いて細胞表面上の T_4 発現についてスクリーニングを行った (20,70) 。 T_4 を発現している形質転換 ϕ -2 細胞は、10⁵ cfu/ml の力値で組換レトロウィルスを産生するものとして同定した。この T_4^+ - ϕ -2 クローンは次にマウス ϕ -AM 細胞感染することのできるレトルトウイルスを生み出す為に使用された。組換レトロウィルスを 10⁴ cfu/ml の力値で産生する T_4 発現 ϕ -AM クローンを単離した。 T_4^+ ヒト形質転換体は、マイトマイシン C 处理又は ϕ -AM クローンとの共培養 (co-cultivation) によって得られた (第 11B 図)。 T_4^+ 形質転換体は次いでノーザンプロット分析にかけ、フローサイトメトリーによって T_4 が発現されて細胞表面に存在していることが確認された。 T_8 表面タンパクを発現するコントロール細胞系も同様の方法で作製した。

T_4 は AIDS ウィルス感染に必須である。

ヒトリンパ球表面に T_4 タンパクが充分に存在し該細胞を AIDS ウィルス感染に対して感受性にし得るか否かについてまず決定するために、アリミティブな T 細胞白血病細胞系、HSB2 の形質転換体、即ち、初期 T リンパ球タンパク T_1 及

び T_{11} のみを表面に発現するものを構築した。HSB2 は T_4 又は T_8 のいずれも発現せず、T 細胞抗原レセプター又は関連 T_3 タンパク複合体のいずれをも発現しない。 T_4 又は T_8 タンパクを発現する HSB2 の形質転換体を選択し、AIDS ウィルスに対する感受性について決定した。AIDS ウィルス感染を評価するために、幾つかの異なる実験手法が採用された。例えば、逆転写酵素の発現 (52)、イムノフルオレッセンスマイクロスコピーによる細胞内におけるウィルス発現 (46)、イムノアッセイによる培養上清中のウィルス抗原の検出 (47)、フィトヘマグルチニン (PHA) - 刺激素精リンパ球を用いた supernate (supernate) サブカルチュアによる感染ビリオンの產生 (46) などが挙げられる。これらのアッセイを用いて、HSB2 細胞系の AIDS ウィルス感染の証拠は得られなかつた (表 I)。

表 I

AIDS ウィルス感染に対する T_4^+ 及び T_8^+ ヒト形質転換体の感受性

ヒト細胞	最大逆転写酵素	細胞質ウィルス	浮遊物 (Supernate) ウィルス量	浮遊物副培養	シンチウム 誘導	VSV(AIDS) シードタイプ 感染	ウィルス 結合
CEM(T_4^+)	675023	+	+	+	+	+	+
HSB2	4245	-	-	-	-	-	-
HSB2- T_8^+	4460	-	-	-	-	-	-
HSB2- T_4^+	190915	+	+	+	+	+	+
Raji	ND	ND	ND	-	-	-	ND
Raji- T_8^+	5595	-	-	-	-	-	-
Raji- T_4^+	103500	+	+	+	+	+	+
HeLa	6438	-	-	-	-	-	-
HeLa- T_8^+	4875	-	-	-	-	ND	-
HeLa- T_4^+	48125	+	+	+	+	+	+

5×10^6 細胞に AIDS ウィルスを接種し、37°Cで24時間インキュベートし、洗浄して新鮮培地に再プレート化した。細胞及び浮遊物を3, 6, 9, 12, 16, 20, 24及び28日に取り出し、4種のウィルス検出アッセイに使用した。即ち、逆転写酵素、細胞質ウィルス、浮遊物ウィルス抗原及び浮遊物副培養である。FU
シードタイプ感染実験の結果は次のように表す。 + (210^3 PFU/ml) ; - ($10\text{PFU}/ml$) ; ND, 測定せず

さらに、AIDS ウィルスに対するレセプターを有する非感染ヒト細胞を AIDS ウィルス産生細胞と共に培養すると広範囲な細胞融合が起ることが以前に示されている(54)。このアッセイにおいては、HTLV-I 及び HTLV-II 産生細胞により多量のシンチウムが生成されているにもかかわらず(データは示していない)、HSB2 細胞を AIDS ウィルス産生 H9 細胞と混合した場合シンチウムの誘導は起らない(表 I)。最後に、AIDS ウィルスのエンベロープ糖タンパクを有する小胞状口内炎ウィルス(VSV)のシードタイプ(pseudotype)を使用して、ウィルスの侵入(entry)を試験した(表 I)(53, 54)。AIDS ウィルスに感染した細胞を VSV により重感染すると、高度免疫抗 VSV 血清による中和に抵抗するのに充分な AIDS ウィルスエンベロープ糖タンパクが一部の子孫(progeny) VSV により得られた。これ等の VSV(AIDS) シードタイプビリオンの宿主範囲は、AIDS ウィルスに特異的なレセプターを発現する細胞に制限される。細胞の侵入及びビリオンの脱被膜の後、トランスカプシド化された VSV ゲノムが複製し、非シードタイプ粒子が生成する。二次感染の間に、感染細胞から放出された子孫

VSV が近くの VSV(AIDS) シードタイプ感染に抵抗性を示す指示細胞(ミンク CCL64 またはウシMDBK 細胞)に侵入し、破壊する。その結果得られる VSV ブラークの形成をカウントする。このように VSV(AIDS) シードタイプの感染により、ウィルスの侵入の定量的細胞病理(cytopathic) ブラークアッセイが得られる(54)。このアッセイにおいては、HSB2 細胞を VSV(AIDS) シードタイプにさらした場合、バックグラウンドに対するブラークは観察されなかった(表 I)。HTLV-I エンベロープ中にカプシド化された VSV RNA のシードタイプ(VSV(HTLV-I))による対照実験では多数のブラークが観察され、これは HTLV-I レセプターを有する HSB2 細胞が VSV を効率的に複製できることを示している。これ等の観察は、AIDS ウィルスエンベロープ中にカプシド化された VSV ゲノムは HSB2 細胞中に侵入できないことを示している。

機能性(functional) T_4 cDNA の HSB2 への導入がこの細胞を AIDS ウィルス感染に対して感受性にするかどうかについて調べた(表 I)。HSB2- T_4^+ 形質転換体を

AIDSウィルスにさらすと、逆転写酵素活性の発現により(52)、免疫蛍光顕微鏡観察による細胞の細胞質中のウィルスの発現により(46)、イムノアッセイを使用しての培養浮遊物中のP_Vウィルス抗原検出により(47)、そしてPHA刺激リンパ球との浮遊物(supernate)副培養による感染性ウィルスの産生により(表I)(46)測定される、有為なウィルス感染が生起する。対照HSB2-T₈⁺細胞はそれぞれのアッセイにおいて一貫して陰性であった。

さらに、異なるT₄⁺T細胞がAIDSウィルスに感染される効率も測定した。HSB2-T₄⁺及びHSB2-T₈⁺形質転換体、天然に単離されたT₄⁺T細胞系CEM、並びにPHA刺激末梢リンパ球を、連続的に10倍希釈したAIDSウイルスにさらし、洗浄し、プレート化して微量培養した。ウィルスに愛する曝露後12日に、イムノアッセイを使用して感染培養の頻度を測定した(第12図)(47)。このようにして、さらした培養の50%を感染されると必要なAIDSウイルスの力値(ID-50)を決定した。PHA刺激末梢リンパ球のID-50は、天然に単離されたものあるいは形質転換T₄⁺細胞系について見られたものの2~3乗倍の大きさである。HSB2-T₈⁺

T₄⁺細胞の感染効率は、天然に単離されたT₄⁺T細胞系CEMについて見られたものより約10倍高い(第12図)。対照HSB2-T₈⁺細胞は、調べた最高のウィルス力値においても感染に対して非感受性である。

シンシチウム形成及びVSV(AIDS)ショードタイプの複製の両方を維持するHSB2-T₄⁺細胞の能力も調べた。HSB2-T₄⁺細胞をAIDSウイルス産生H9細胞と共に培養すると、18時間以内にシンシチウム形成が容易に観察される(表I及び表II)。さらに、シンシチウム誘導は培地を抗T₄Aモノクローナル抗体で前処理することにより消滅する(表II)。そしてHSB2-T₄⁺細胞をVSV(AIDS)ショードタイプにさらすと、感染性VSV粒子が生成され、多くの指示細胞を破壊する(表I及びIII)。さらにブラーク形成は、抗AIDSウイルス抗体または抗T₄Aモノクローナル抗体による前処理により阻害される(表III)。対照HSB2-T₈⁺細胞は、AIDSウイルス感染の検出に用いた7つのアッセイのそれれにおいて、一貫して陰性であった(表I、II及びIII)。これ等の観察は、ヒト未成熟Tリンパ球においては、T₄タンパクが単に存在することがAIDSウイルス感染に必

要な本質的機能をもたらすという遺伝学的証據を与えるものである。

表 II

T₄⁺ヒト形質転換体におけるシンシチウム誘導

ヒト細胞	シンシチウム誘導		
	H9/AIDS	H9/AIDS + αCT ₄ A	ND
JK(T ₄ ⁺)	++++	-	
8166(T ₄ ⁺)	++++	-	
HSB2	-	ND	
HSB2-T ₈ ⁺	-	ND	
HSB2-T ₄ ⁺	++	-	
Raji	-	ND	
Raji-T ₈ ⁺	-	ND	
Raji-T ₄ ⁺	+++	-	
HeLa	-	ND	
HeLa-T ₈ ⁺	-	ND	
HeLa-T ₄ ⁺	++++	-	

2×10⁵細胞を2×10⁴のAIDSウイルス産生H9細胞

(H9/AIDS)と共に培養し、37℃でインキュベートした。18時間後にシンシチウム形成について培養を調べた。結果はシンシチウムに含まれる核の概算パーセンテージで示す。-(シンシチウムなし): ++(25%) ; +++(50%) ; +++++(90%) ; ND(測定せず)。シンシチウム阻害は、抗T₄Aモノクローナル抗体(αT₄A; 1:20)を接種時に混合培地に加えて測定した。天然に単離されたT₄⁺T細胞系JM及び8166をこれ等の研究の陽性コントロールとして使用した。

2×10^5 細胞を VSV (AIDS) シュードタイプ (53,54) と共に 1 時間 37°C でインキュベートした。次に細胞を洗浄し、 1×10^6 ミンク CCL64 またはウシMDBK ブラーカー指示細胞を各ウェルに加えた。これ等は VSV 感染を許容するが、VSV (AIDS) に対して抵抗性である。培地を寒天培地で覆い、感染後 2 日に VSV ブラーカーをカウントした。抗 T_4 A モノクローナル抗体 ($\alpha T_4 A ; 1 : 20$) または抗 AIDS ウィルス血清 ($\alpha AIDS ; 1 : 10$) を使用してシュードタイプ (54) にさらす 30 分前に細胞を前処理することにより VSV (AIDS) シュードタイプ ブラーカー形成を阻止した。広範囲な種類のヒト細胞型 (54) 上にプレートする VSV (HTLV-I) シュードタイプをこれ等の実験の対照として用いた。VSV (HTLV-I) シュードタイプ ブラーカー形成を阻止するのに抗-HTLV-I 血清 (1 : 10) を用いた。結果は PFU/ml 及び ND (測定せず) で表す。

(以下余白)

説明 III

 $T_4^+ B E U T_4 +$ ヒト形質転換体についての VSV シュードタイプ ブラーカー アンセイ

ヒト細胞	VSV シュードタイプ ブラーカー PFU/ml		VSV (AIDS)	$\alpha AIDS$	$\alpha T_4 A$
	+	-			
CEM(T_4^+)	20,000	50	ND	ND	ND
HSB2- T_8^+	*	50	ND	ND	ND
HSB2- T_4^+	*	50	ND	ND	ND
Raji- T_8^+	*	5,000	ND	ND	ND
Raji- T_4^+	*	5,000	ND	ND	ND
HeLa	*	10,000	ND	ND	ND
HeLa- T_4^+	*	10,000	ND	ND	ND

AIDS ウィルスの感染は T リンパ球へのみに制限されない

機能性 T_4 cDNA を 2 種のヒト非 T 細胞系に導入した。即ち、子宮癌由来する上皮細胞系である HeLa (72) 及びバーキットリンパ腫の患者由来する B リンパ芽球様細胞系である Raji (73) である (第 11B 図)。レトロウィルス媒介の遺伝子転移の前は、これ等の細胞系は表面 T_4 タンパクあるいは T_4 mRNA を発現せず、AIDS ウィルス感染に対し感受性ではない (表 I)。さらに親細胞系はシンシチウムの誘導及び VSV (AIDS) シュードタイプのプレーティングを維持しない (表 I, II 及び III)。

これに対し、 $T_4^+ Raji$ 及び HeLa 形質転換体は、前記した全ての基準により AIDS ウィルス感染を保持した (表 I)。

Raji- T_4^+ 細胞が AIDS ウィルスに感染され得る効率は、
HSB2- T_4^+ 細胞の場合とはほぼ同様であり、天然に単離された T_4^+ T 細胞 CEM の感染の効率の約 10 倍高いものである (第 12 図)。さらに、AIDS ウィルス産生 H9 細胞との共培養においては、Raji- T_4^+ 及び HeLa- T_4^+ 細胞はシンシチウム誘導を保持し、これは抗 T_4 A モノクローナル抗体での前処理培養により消滅する (表 I 及び II, 第 13 図)。さらに、こ

れ等の細胞を VSV (AIDS) シュードタイプにさらすと、感染性 VSV が產生され、ブラーカーが形成されるが、これは抗 AIDS ウィルス抗体または抗 T_4 A モノクローナル抗体での前処理による阻止される (表 I 及び III)。対照 Raji- T_8^+ 及び HeLa- T_8^+ 形質転換体はこれ等の測定のそれぞれにおいて一致して陰性である (表 I, II 及び III)。

従って、機能性 T_4 遺伝子のヒト T リンパ球、B リンパ球あるいは上皮細胞への導入は、これ等の細胞を AIDS ウィルス感染に感受性にするに充分なものである。まとめると、これ等の観察は *in vivo* で観察される T_4^+ T 細胞の指向性は T_4 分子の制限された発現の結果であり、それが発現された細胞型の性質ではないことを示している。

(以下余白)

AIDSウイルスは表面T₄蛋白質に結合する

前記の実験はT₄発現がAIDSウイルス感染に必要とされる遺伝的証拠を提供するが、ウイルス生活環におけるこの分子の役割に関する知見は与えない。T₄の表面発現がAIDSウイルス感染に必要であるという観察は、T₄がAIDSウイルス受容体であることを示唆している。従ってT₄⁺及びT₈⁺形質転換ヒト細胞の表面に対するAIDSウイルスの結合を吟味するにはクルオロサイトメトリーが使用された(表I; 第14図)。HSB2, Raji, 及びHeLa細胞、並びにT₄⁺又はT₈⁺形質転換体をAIDSウイルスと共に定温培養した。ウイルス吸収に次いで、細胞を洗浄し、フルオレセイン共役した抗AIDSウイルス抗体に曝露して、フローサイトメトリーにより解析した。この試験によりAIDSウイルスは表面T₄を発現するヒト形質転換体には有効で特異的に結合するが、T₄⁻親細胞にもT₈⁺形質転換体にも結合しないことを示した(第14図B欄、表I)。AIDSウイルスのT₄⁺細胞に対する結合は抗T₄モノクローナル抗体と予偏培養することにより阻止されるが、抗T₈モノクローナル抗体との予偏培養では止められない(第14図、C欄)。更に、T₄⁺形質転換細胞

をAIDSウイルスに曝露するばあい、T₄蛋白質はウィルス外膜(envelope)糖蛋白質と共同沈降するのであって、これはこれらの分子間の直接の物理的結合を示唆している(データは示さない)。これらの結果はAIDSウイルスが細胞表面上のT₄分子に結合することと、この結合は試験したT₄⁺細胞のすべての型に生起するのでT細胞特異性の他の蛋白質には無関係であることを示している。

以前の研究では包み込まれたウイルスについて2つの別個の進入経路が記載されている(74,75,76,77)若干のウイルスは原形質膜と直接融合するものがあり、そのヌクレオカプシドを細胞質中に放出するのであって、その際ウイルスの他のものは受容体仲介のエンドサイトシスにより取り込まれてしまう。その際、エンドソームの酸性環境は液胞の境界膜とのウィルス外膜の融合を容易にする。細胞封入体経路を経由して細胞に入るウイルスによる感染は、エンドソームから脱酸する弱塩基のような薬剤を用いて細胞を処理することによって抑制することができる(58,78,79,80)。塩化アンモニウムの存在で、エンドソーム中では融合が遮断されるがリソソーム低下はなおも低下した速さで進行する(80)。

かような訳でT₄⁺T細胞系JMのAIDSウイルス感染に対する塩化アンモニウムの影響を試験した。塩化アンモニウムのないばあいは、AIDSウイルスに曝露したJM細胞の50%以上が、感染後5日でウイルス抗体を発現することは免疫蛍光法鏡検により測定された通りである。ウイルスの添加時か又はウイルス添加後30分以内かのいずれかで、JM細胞を塩化アンモニウムに(6時間)曝露するばあい、ウイルス感染の95%より大きな阻害が認められた。しかし、ウイルス添加後1時間で細胞を塩化アンモニウムで処理したばあいは、感染の阻害は認められず、受容体仲介のエンドサイトシスを経て細胞に入る他のウイルスに対し記載したウイルス侵入の速度論と一致する免見であった。結局、塩化アンモニウム効果は完全に可逆的であった。塩化アンモニウムに1時間曝露した後、洗浄により同化合物を無くしてAIDSウイルスに曝露した細胞は、ウイルス性感染の制御水準を支持した。これらの結果は、塩化アンモニウムの除去の際、エンドソームのpHが1~2分以内で当初の低い値に戻るという以前の観察と矛盾しない(78,80)。エンドソームを脱酸する化合物であるアマンタジンを用いて同様な結果が得られた。

これらの結果は、T₄-AIDSウイルス複合体のエンドサイトシス及びエンドソーム境界膜とのウィルス外膜の、低pH誘発融合してかかわり、細胞の細胞質中にウイルス性ヌクレオカプシドを放出するウイルス侵入の機序と整合する。

T₄メッセンジャーリボ核酸は脳で発現される

細胞免疫系統の破壊に加えて、AIDSがしばしば伴うのは、中枢神経系(CNS)障害であって、それはAIDSウイルスによる脳細胞の直接感染の結果と考えられる(81)。従ってT₄がCNS内の細胞に発現し、これによりウイルスの向神経性の説明を提供するかどうかを決定することに关心があった。T₄mRNA配列がCNSに発現するかどうかを決定するためヒトとマウスの両方の脳から調整したRNAのノーザン・プロット解析を実施した(第15図)。ヒト大脳皮質由来のポリ(A)⁺RNAはほぼ3及び1.8kbの分子量を持つ2つの別個のT₄mRNAを含む(第15A図)。より弱い3kbRNAは2つのT₄⁺白血病細胞系、即ちU937(単球細胞系)及びJurkat(T細胞系)、並びに末梢性Tリンパ球によって発現するメッセンジャーリボ核酸(mRNA)と大きさが同じである。小さい方のより豊富な1.8kb mRNAはTリンパ球を欠き、別

法のスプライシング又は代替の5'又は3'未満から生成することができた。

T_4 mRNAの局在の更に慎重な解析はマウス脳の特定領域からポリ(A)⁺RNAを単離することにより実施した(第15B図)。 T_4 のネズミ相同染色体である $L_3 T_4$ を記号化する放射性標識cDNAによるハイブリッド形成は、後脳試料には存在しないマウス前脳中の強度の2.2kb mRNAを明らかにした。2.2kb $L_3 T_4$ mRNAは皮質、視床下部に検出が可能で、線状体にもっとも豊富にあるが、小脳、脛幹、又は脊髄には存在しない(データは示さない)。CNS中に検出される2.2kb mRNAは胸腺細胞中の $L_3 T_4$ を記号化する3.2kb mRNAよりも小さく、約1kbである(第15B図)。これらの結果は、AIDSウィルスが発揮する向神経性が脳細胞に及ぼす T_4 分子の表面発現の結果と思われる。前脳で検出されるmRNAの水準は胸腺細胞中の水準の約1/30である。このことは大多数の細胞による低水準の発現又は小さい部分集団の細胞による比較的高水準の発現を反映するともいえる。 T_4 が神経細胞又は支持細胞により発現されるかどうかは現在知られていない。しかしながらCNS中の異形転写体(variant

transcript)の存在は、脳の T_4 mRNAが稀少な侵入Tリンパ球により発現することを確からしくしている。

討論

T細胞の機能的に別個なサブセットを用いる T_4 及び T_8 の分離はこれらの分子が適当な標的細胞とTリンパ球の相互作用において重要になり得ることを示唆している。これらの蛋白質の特異的役割を理解する第一歩として、cDNAクローニングが T_4 及び T_8 の両分子について得られ、それらの核酸塩基配列が決定された(20, 70)。 T_4 及び T_8 の演繹した蛋白質配列の比較は、これらの分子が免疫グロブリン可変(V)ドメインを持ち、且つ免疫グロブリン超遺伝子系統群(supergene family)の構成員としての有意性配列と構造上の相同意を共有することを示している。しかしながら、 T_4 及び T_8 のN-末端V-様領域は全く異なる。すなわち、それらの分子は28%の相同意を共有しているに過ぎず、従って各分子の免疫グロブリン軽鎖に対する相同意よりも分子相互の相同意の方が低い(第9A図)。更に、 T_4 と T_8 との間の最大維持(conservation)領域はまた免疫グロブリンに対する最も強力な相同意領域及びT細胞リセプターV領域でもある。従ってこれらの二つの分子の免

疫グロブリン様領域は、構造的に類似しているけれども、それらが標的細胞の異なるサブセット上の異なる分子を認識するという仮説と矛盾しない意味のある配列相違(divergence)を示している。

T_4 及び T_8 のN-末端領域によって共有されるV-様領域の構造的相同意部分は、これらの蛋白質の機能に特に関連したものであるかも知れない。免疫グロブリン超遺伝子系統群の実質的にすべての種類は、免疫応答に関係している(62)。更に、この系統群の個々の種類は互いに強力に会合して二量体を形成する傾向を示す。この会合は免疫グロブリンの重鎖と軽鎖、T細胞抗原リセプターのα鎖とβ鎖、 β_2 -ミクログロブリンとクラスI MHC蛋白質、並びにクラスII MHC分子のα鎖とβ鎖の相互作用において明白である。 T_8 糖蛋白質は、推定されたMHC様分子である T_8 と胸腺細胞表面上でジスルフィド結合を形成し、また末梢Tリンパ球上の32kdサブユニットの多重体として存在している(83)。 T_4 中の4つのV-様領域の存在は、これらの領域が相互に、及び他の細胞又はウィルスの表面上の特異的リガンドと会合することを示している。免疫グロブリン-様分子のこれらの特異的親和性は、 T_4 及び T_8 の認識機能

にとって重要であるのかも知れない。

T_4 の進化

免疫グロブリン及びT細胞抗原リセプター遺伝子において、V及びJエクソンは広く分離され、体細胞の組換えイベント(somatic recombination event)の後にのみ、並置されるようになっている(62, 63)。 T_4 mRNAは、DNA組換えイベントを必要とすることなく、連続的(contiguous) V-及びJ-様エレメントを4つコードする。従って、 T_4 は再配列(rearrangement)メカニズムの発生以前に生じたより原始的な遺伝子を反映している可能性がある。このことはさらに、最初の T_4 のV-様領域(V1)が、免疫グロブリンもしくはT細胞抗原リセプターのいずれかをコードするV遺伝子中に存在しないイントロンによって分割されているという最近の知見によって支持される。イントロンが進化過程で注意深く除かれることが及び、イントロンが以前にはイントロンのない環境中に挿入されることは極めてありうることであるということは、度重なる証拠から示唆されている。このように、 T_4 は先祖の免疫グロブリン遺伝子を表わしていると思われ、この遺伝子が複製、分岐、及び再配列(転位)して現在の免疫グロブリン遺伝子フ

アミリーを形成したと考えられる。現在の極めて複雑な免疫系においても機能しているが、 T_4 はより原始的な細胞系免疫応答において機能するレセプターを反映しているであろう。無脊椎動物のもののように、原始的な免疫応答は、レセプター分子の逸脱レパートリヤー (diverse repertoire) を含まないと考えられるが、最も単純な場合には、自己及び非自己の間の区別に限定され(85,86)、さらに再配列を起こさない「静的な」遺伝子群によって説明されると思われる。

進化時に T_4 の出現の順序がどのようにあれ、この遺伝子の構成はエクソン混合 (shuffling) の興味深い例を示している。 T_4 は 4 つの V - J - C 領域から成っており、J - C 領域及び膜間セグメント (transmembrane segment) は、スーパー遺伝子ファミリーの異なるメンバーでの相同性を各々分け合っている。V - 及び J - C 領域は、免疫グロブリンと T 細胞抗原レセプター領域の両方の相応する領域と相同である。膜間領域は、クラス II MHC 分子の β - 鎮におけるこの領域とかなりの相同性を示す (第 9C 図)。従って、 T_4 は免疫グロブリンのスーパー遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーにおいて保存されたエクソンの集合から成っており、この遺伝子ファミリーは異なった

様式で混合されて、免疫応答に関与する種々の多くの分子を生成する。

T_4 は AIDS ウィルスレセプターである

本明細書で提供したデータは、先ず細胞表面において AIDS ウィルスと T_4 分子との特異的会合を伴う AIDS ウィルス感染のメカニズムを示す。この会合は、T リンパ球、B リンパ球及び上皮細胞において証明され得、従って T 細胞特異的タンパクの関与を必要としない。更に、本明細書に提供するデータは、 T_4 - AIDS ウィルス複合体はレセプター仲介エンドサイトーシスによりインターチェリネーションされ、次いでウィルスエンベロープはエンソームの制限膜と融合し、ヌクレオキナーゼを細胞質に放出することを示す。ウィルス複製及び転写は、リンパ系及び非リンパ系細胞株の两者で起こり得る。更に、 T_4 遺伝子は脳並びにリンパ球において発現し、AIDS ウィルスの二重向神経性 (dual neurotropic) 及びリンフォトロピック (lymphotropic) 特性に対する一つの説明を提供する。このやり方において、特に T_4 細胞の集団に対する AIDS ウィルスを標的とするため、エフェクター細胞 - 標的細胞相互作用を仲介するのに重要な T リンパ球表面タンパクが、ヒトレトロウ

イルスによって利用してきた。

細胞表面レセプターは多數のエンベロープド・ウィルスについて同定されてきており、しばしば宿主の範囲及び特定ウィルスの指向 (tropic) 性はこれらのレセプターの発現のパターンのせいである (74,78)。あるウィルスはごく狭い範囲の細胞タイプに感染し、標的細胞の特定集団におけるウィルスレセプターの発現に影響する。例えば狂犬病ウィルスはニコチニン性アセチルコリンレセプターと相互作用し、骨格筋とニューロンに大きく感染する (87)。ところが EB (Epstein-Barr) ウィルスは C3d 捕体レセプター・タイプ 2 と相互作用し (88)、B リンパ球に感染する。ミクソウイルスのような他のウィルスは細胞表面上に偏在的に分布するシアル酸残基と相互作用し、より広範囲の細胞タイプに感染する。

細胞表面レセプターの制限された発現は、ウィルスの向性に対する唯一の説明を提供する。あるウィルスは、分化した細胞タイプの制限された 1 つのセットにおいてのみ複製する。従って、Moloney マウス白血病ウィルス (Mo-MuLV) はマウス新生児において T 細胞リンパ腫を誘導し、更に、きわめて間連する Friend ヘルバーマウス白血病ウィルス (Fr-MuLV) は主として赤

白血病を誘導する (80,90,91)。この向性は、T リンパ球の Mo-MuLV ゲノム及び赤血球先駆体の Fr-MuLV ゲノムの効率的な転写を促進する LTRs における相違の結果と思われる (92,93,94)。

本明細書に示したように、AIDS ウィルスの一次向性決定因子は標的細胞の表面における T_4 タンパクの発現である。リンパ系細胞及び骨髄性細胞並びに脳細胞への *In vivo* 感染は制限される：3 つの集団は T_4 を表す。*In vitro* 実験は T_4 の T_4^+ ヒト B リンパ球及び上皮細胞（これらの細胞は AIDS ウィルスにとっての天然の標的ではなく、AIDS ウィルスによる生産性感染に感受性にする）への誘導を示す。

実施例 1：可溶性 T_4 フラグメント

可溶性 T_4 蛋白質フラグメントを細胞標品から制限プロテアーゼ消化を使用して調製する。代わりに、トランスメンブラン・ドメイン（領域が中性及び疎水性残基を含む）を欠く T_4 フラグメントをコードする DNA 発現ベクターを構築し、そのような T_4 フラグメントを作るのに使用してもよい。これらのフラグメントは水溶液で可溶であり、リーダー（シグナル）配列を有する。哺乳類細胞で発現する場合、これらのフラグメントはラフ小胞体 / ゴルジ複合体に輸送され、結局は細胞から

分泌される。

実施例2：AIDS患者の治療

患者の血液及び他の体液中に存在するウィルスに結合して、in vivoでT₄⁺細胞の感染をブロックするため、実施例1に記載した可溶性T₄糖タンパク質フラグメントは、典型的には医薬的に許容可能なキャリヤー中で、ヒト免疫不全症ウィルスに感染した患者に投与される。代わりに又は更に、ウィルスが血液から分離し得るように患者の血液は固定化T₄糖タンパク質又は可溶性T₄フラグメントのいずれかを含むカラムを介して循環される。そのような処置は免疫システムがウィルスに対しより効果的な免疫応答をすることを可能にする。即ち非感染T₄⁺細胞を増殖させる。

可溶性T₄フラグメントは治療学的なもの、即ち使用するHIV感染の細胞外及び細胞-細胞拡散の阻害剤として使用する。本発明人は、可溶性T₄フラグメントがin vitroでHIVがT₄⁺様の細胞に対して結合、感染するのを阻害することを示した（実施例4参照）。可溶性T₄フラグメントのHIVに感染したヒトへの投与は、ウィルス感染の細胞外拡散を阻害する。更に、HIV-感染T₄⁺細胞及び非感染T₄⁺

細胞の融合（これはウィルスが拡散するルートである）は可溶性T₄フラグメントの投与により阻害される。

従って、可溶性T₄フラグメントの投与は病気の進行を遅らせ、AIDSに伴ういくつかの症状を軽減し、新しい病理学的変化の発生を防ぐ。

生化学的に純粋で水溶性試薬である可溶性T₄フラグメントは、T₄-HIV相互作用の競合体（competitors）を分析する他の試薬と組み合わせて使用する。HIVエンベロープタンパク又はHIVエンベロープタンパクを含有する生化学的混合物と組み合わせた可溶性T₄フラグメントを、ウィルス結合の阻害剤をスクリーリングするのに使用する。

実施例3：可溶性T₄フラグメントの製造

膜結合したT₄タンパク(pT₄B)をコードするcDNAを単離し、特徴化し、哺乳類細胞タイプの変種で発現させた(70)。可溶性T₄フラグメントはバクテリア、酵母、昆虫及び哺乳類の系で産生する。恐らくT₄タンパクは複雑に折り重なっているため、哺乳類の系における発現が好みしい。可溶性T₄フラグメントはV₄J₄ドメインの後でpT₄Bの端を切り取ることにより産生する。このようなDNAフラグメントは

ransmembranousセグメントの前で終結し、ヌクレオチド位置約1264で開始する（第6図）。この組み換えDNA分子はトランスマembraneと細胞質ドメイン両者を欠く。EcoRI-HpaIIフラグメント（ヌクレオチド1～1252を包含する）をpT₄Bのより小さいフラグメントから構築することにより、単離する。代わりに、膜ースパンニング(spanning)のみを除去し、細胞質ドメインに融合したV₄J₄ドメインを脱離する。1つのアプローチは、pT₄B由来ヌクレオチド1252～1342からHpaII部位を補うフラグメントを除去することである。このような構築物は、ラフ小胞体／ゴルジ複合体に進入し、結果として細胞から分泌するに必要なT₄シグナル配列を維持するさらに、これらの構築物はT₄タンパクの細胞外部分を維持し、ここでヒト免疫不全症ウィルスエンベロープ糖タンパク質が存在する。

哺乳類系で可溶性T₄フラグメントを発現するために、修飾したT₄cDNAフラグメントを、強い真核生物プロモーター／エンハンサー並びにRNAのポリアデニル化及び切断に必要なポリアデニル化部位を含むベクターにサブクローンする。例えば、シミアンウィルス(SV40)の初期プロモーター及びエ

ンハンサーは、可溶性T₄cDNAフラグメントから上流に位置する。SV40又は可溶性T₄cDNAフラグメントから下流のヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかのポリアデニル化部位を配置することにより、転写終結及びRNAポリアデニル化が達成する。当業者に公知の任意の方法により選択マーカーと一緒にこれららのエレメントを含有する構築物の真核生物への導入は、外因性DNAの安定な組み込みを導く。選択培地におけるその成長能力により選択される形質転換体は、培養上清液へ可溶性T₄フラグメントを分泌する。可溶性T₄フラグメントはいくつかのアッセイの内の1つ（例えば、ラジオイムノ沈降法）により上清液中で検出し、精製する。可溶性T₄フラグメントの精製及び特徴化は細胞株を構築することにより著しく増強され、これは分泌したタンパクフラグメントを発現過多にする。タンパクの発現過多にさせる方法が、バクテリア、酵母、昆虫及び哺乳類の系で使用された。もし構造的に発現したなら有毒であるタンパクを生産過多にするため、誘導可能な発現系もバクテリアと酵母において使用された。可溶性T₄フラグメントの発現過多は可溶性T₄発現ベクターを増幅することにより完成され、構造的発現過多になる。薬剤メトトレキセート(dhfr

の拮抗剤) の連続的に増す濃度の成長によりジヒドロ葉酸レダクターゼ ($d h f r$) 遺伝子の増幅が広く用いられた。配列をコードする $d h f r$ に対し増幅されたユニットは制限されないので、このアプローチはそれらに隣接する配列の同時増幅 (coamplification) する結果になった。従って、 $d h f r$ を選択的マーカーとして、及び新たに導入した配列を同時増幅する手段として使用する。この方法は、 $d h f r$ プラスミドでコトランスクォーメーションされた種々の遺伝子の発現を増加するのに首尾よく使用した。別の増幅スキームはプラスミド $p\text{dLAT}-3$ と可溶性 T_4 cDNA 発現ベクターのコトランスクォーメーション、次いで既に記載した選択を伴う(102)。

従って、可溶性 T_4 cDNA 発現構築物は、 $d h f r$ 発現プラスミドとコトランスクォーメーションされる。代わりに、可溶性 T_4 cDNA フラグメントと同じプラスミド上に $h f r$ 遺伝子が存在し、リンクしたコトランスクォーメーションを許す。これらの構築物の $d h f r$ -欠失 ($d h f r^-$) チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞へのトランスクォーメーション及び続くメトトレキセートにおける選択は、新たに導入した配列を発現する安定な形質転換体を分離させる。いくつかのクローンを

精製し、培養上清液を回収し、可溶性 T_4 フラグメントの存在を分析する。可溶性 T_4 フラグメントの最大レベルを産生するクローンはノーザンプロット及びサザンプロット分析により更に特徴化される。次いでこれらの細胞株は、徐々に濃度が増したメトトレキセートを含む選択培地で培養される。この選択的压力は新たに導入した $d h f r$ 遺伝子及び隣接 T_4 配列を増幅した。メトトレキセート最大濃度に達した後、生き残った細胞をノーザンプロット及びサザンプロット分析して、増幅の程度を決定し、可溶性 T_4 フラグメントの存在について培養上清液を調べた。

培養上清液中の可溶性 T_4 フラグメントの特徴化のため、いくつかの形質転換体を ^{35}S -メチオニンで代謝的にラベルする。細胞溶解物 (lysates) 及び上清液を次いで市販の抗- T_4 抗体を使用するラジオイムノ沈降法及びウエスタンプロット分析で分析する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を沈殿物上で実施し、分泌され、端を切った形の T_4 の予想相対分子量 (Mr) を観察する。哺乳類系で合成されるので、このタンパクは適当にグリコシル化し、折り重なっており、即ちジスルフィドブリッジが形成する。培養上清液から可溶性 T_4

フラグメントを精製するため、抗- T_4 抗体を使用するイムノアフニティーカラムクロマトグラフィーを実施する。カラムに結合したタンパクを高い塩濃度及び低pHで溶出する。Mr 及び溶出したタンパクフラクションの純度を決定するため、溶出した物質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施する。アフィニティー精製した物質をより特徴化するため更に、ラジオイムノ沈降及びウエスタンプロット分析をも実施する。

可溶性 T_4 フラグメントを产生するために同様のアプローチをバクテリア、酵母、昆虫で行ってもよい。更に、本明細書で記載したより小さいサイズのフラグメント (例えば $V_1 J_1 D$ メインのみを含有するような) を产生してもよい。

(以下余白)

ベクターの構築

組換え DNA 操作を使用して、ヒト T_4 cDNA 配列の塩基対 (bp) 1-1257を、SV-40 初期プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域に従属する TAA 終止コドンとの間に配置した。 T_4 cDNA のこの配列は T_4 リセプターのリーダー及び予言された細胞外ドメインをコードしている。この sT_4 ミニ遺伝子をヒト H-ras 又はマウスジヒドロ葉酸リダクターゼと結合して、夫々ベクター $pST_4\text{CHras}$ 及び $pST_4\text{DHFR}$ を作製した。これらのベクターの構築を以下のように行った。

$pST_4\text{sal}$ の構築:

プラスミド $pST_4\text{sal}$ を、他の 2 つのプラスミド JRT_4 及び $pUCsT_4$ から構築した。これらのプラスミドの構築を以下に詳述する。

プラスミド JRT_4 を構築:

プラスミド JRT_4 を作製するためには、プラスミド $DSP1$ (103) を Xba I で切断し、SV40 ポリ A の初期領域を欠失し、 Xba I 部位を DNA ポリメラーゼのクレノー (Klenow) 断片を用いて塞いだ (filled in)。ウシ成長ホルモンポリアデニル化

領域(113)をBglII及びKpnIで切断し、KpnI部位をT₄cDNAポリメラーゼで処理して平滑化した。この230bp断片をDSP1に結合してDSP1BZBGHを作製した。DSP1BZBGHをSalI及びSalIで切断し(SV40初期プロモーター、galkコード領域及びBGHポリA領域から成る)galkカセット(cassette)を、SalI末端、BglII末端及びSalI末端から成る合成リンカーを使用することにより、pUC19(107)中のSalI部位に結合した。この3つの部分結合の結果、プラスミドDSP1BZBGH.JTが得られた。

DSP1BZBGH.JTをStuI及びBclIで切断してgalkコード領域を消失させたものを、プラスミドpT₄B(70)由来T₄cDNAを含む1.7kbのEcoRI(フィールドーイン)-BamHI断片に結合して、プラスミドJRT₄を作製した。

プラスミドpUCsT₄の構築:

プラスミドpUCsT₄を作製するため、プラスミドpT₄B由来T₄cDNAのHaeIIおよびHpaII断片(1125bp)を、XbaI及びXbaIで切断されたベクターpUC18に合成リンカーを使用して結合した。T₄cDNAのHaeII末端を、KpnI末端及びHaeII末端をもつ合成リンカーを用いて

pUC18のKpnI部位に結合した。T₄cDNAのHpaII末端を、HpaII末端及びXbaI末端をもつ合成リンカーを用いてpUC18のXbaI部位に結合した。このリンカーもT₄コード領域のヌクレオチド1257の後のTAA停止コドンに挿入した。得られたプラスミドはpUCsT₄であった。

プラスミドpS_T₄salを作製するため、プラスミドJR-T₄をBglII及びSacIで切断して(SV40初期プロモーターとT₄cDNAの最初の602個のヌクレオチドとから成る)、959bp断片を単離した。プラスミドpUCsT₄をSacI及びXbaIで切断して(合成リンカー由来TAAコドンに従属するヌクレオチド603-1257に由来するT₄cDNAから成る)、660bp断片を単離した。これらの2つの断片を、BglII及びXbaIで切断してSV40初期プロモーター及びフルレンジスT₄コード領域を消失させたDSP1BZBGH.JT中に結合した。

pS_T₄DHFRの構築:

プラスミドpS_T₄DHFRを作製するため、β-グロビンDHFR発現カセットを含むBglII-BamHIをpS_T₄salのBamHI部位に結合した。β-グロビン

DHFR発現カセットは、マウスβ-グロビンプロモーター(BglII部位を含有させるために合成リンカーを用いてプラスミドpPK288(108)の5'末端を修飾した。該プラスミド由来の550bp HindII断片)、マウスDHFRコード領域(プラスミドpSV2-DHFR(109)由来の735bp HindII(フィル-イン, fill-in))、DSP1(103)由来のNheI(フィル-イン)-BamHI(フィル-イン)SV40ポリA初期領域、及びマウスDHFR終止領域(BamHI部位を作製するために合成リンカーを用いてプラスミドmDH9(110)の3'末端を修飾した該プラスミド由来の907bp HindIII(フィル-イン)断片)から成る。pS_T₄DHFRのプラスミドマップは図示のとおりである。

pS_T₄cHrasの構築:

プラスミドpSVK(111)をEcoRV及びHindIII(フィル-イン)で切断してgalk領域を除去し、さらにプラスミドpSKcHras(112)由来の、cHrasに関するコード領域を含む870bp NdeI(フィル-イン)-(ヤエナリ(mung bean)ヌクレアーゼによって平滑化された)SalI断片中に結合することによってプラスミドpMERcHrasを作製した。

可溶性T₄転写カセットをBglII-BamHI断片を経てpS_T₄salから取り出し、pMERcHrasのBamHI部位(SV40初期ポリAに対して3')中に結合してpS_T₄cHrasを作製した。

哺乳類細胞中での可溶性T₄(sT₄)ミニ遺伝子の発現

NIH-3T3細胞中でのpS_T₄cHrasの発現:

10μgの粗体DNA(NIH-3TSゲノムDNA)の存在中、G418耐性を有するベクターであるプラスミドpTKnef 10μgを用いて、リン酸カルシウム沈澱法により、プラスミドpS_T₄cHras(10μg)をNIH-3T3細胞(前日、60mm培養皿当たり5×10⁵細胞を接種したもの)上に共沈澱させた。この細胞を沈澱DNAと一緒に37°Cで6時間インキュベーションした。DNA沈澱物を取り出し、新鮮な培地(DMEM, 5%Nu-Serum^R(Collaborative REsearch, Inc., Lexington, Massachusetts))を該皿に加えた。16時間後、細胞をトリプシン処理し、3つの100mm皿中に接種し、次いで上記培地中に維持した。foci(約50/mm²)が12-14日以内に現われた。形質転換されたfociのうち11個を選択し、広く引き伸ばした後、上記培地+500μg/ml GENETICIN^R G418(Cibco Laboratories.

Grand Island, New York) 中に選択用の細胞 5×10^5 個/100mm²皿を接種した。11個のクローン全てが G418 選択(500 μg/ml)に生き残ったが、次に該クローンを標準タンパク質イムノプロット分析により H-ras (pZ1) に関してスクリーニングした。

最も高いレベルの pZ1 (約 2 ng pZ1 / μg - Triton 可溶性タンパク質) を発現したクローンを、³⁵S-標識メチオニン及びシスティンと一緒に 18 時間インキュベーションした。培養上清及び細胞溶解物を、T₄ (OKT₄, OKT_{4A}) 及び T₈ (OKT₈) リセプターに対して特異的なモノクローナル抗体、又は非特異的マウス IgG を用いて免疫沈降させた。sT₄ 予言されたサイズである約 45kd のタンパク質を、T₄ リセプターに対するモノクローナル抗体の両方を用いて培養培地から特異的に沈降させた。細胞溶解物中に、sT₄ バンドは観察されなかった。期待どおり、pZ1 を該細胞から沈降させたが、培養上清からは沈降しなかった。これに続く定量は、精製 sT₄ と比較して、これらの細胞が、実施例 2B に記載の CHO 細胞を使用した場合よりも約 100 倍低い比較的低レベルの sT₄ を

産生することを示している。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 中での pST4

DHFR の発現:

DXB-11細胞、すなわち DHFR 分化 CHO 細胞系(104)を、10 μg の粗体 DNA (NIH-3H3ゲノムDNA) の存在中、10~30 μg の pST4 DHFR を用いてリン酸カルシウム沈澱によりトランスフェクションし、1日後、60mm皿に 5×10^5 細胞を接種した。この細胞を DNA 沈降物と一緒に 37°C で 6 時間インキュベーションし、培地を取り除き、次いで新鮮な培地 (F12, 10% FBS, 100 ユニット/ml ベニシリソウ及びストレプトマイシン) を該皿に添加した。16時間後、培地を再び交換し、細胞をさらに 24 時間インキュベーションした。次に、細胞をトリプシン処理し、3つの 100 mm皿中に接種し、ヌクレオシド非含有培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを含まない F-12, 10% 透析 FBS、並びに 100 ユニット/ml ベニシリソウ及びストレプトマイシン) 中で選択した。7~10 日以内でコロニー (約 100/皿) が現われた。各皿からコロニーをプールし、広く引き伸ばした後、24穴培養プレート中に 5×10^3 細胞/ウェル及び 5×10^4 細胞/ウェルを、又は 5×10^5 細胞/100mm²皿を

接種した。20nM メトトレキセート (mtx) を含有するヌクレオシド非含有培地中で選択を開始する 3 日前に細胞を回収した。個々のウェル又はクローンを sT₄ 発現に関して集合的にアッセイし、さらに增幅用に選択したクローンを上記の密度で 24 穴培養プレート中に接種した。接種後 3 日目に、ヌクレオシド非含有培地中の 800nM mtx での選択を開始した。この選択法を 8 μM mtx 及び 30 μM mtx での選択に繰り返し使用した。この方法を用いて、最小 3 pg/細胞/24 時間で可溶性 T₄ を発現する数個の細胞系を誘導した。

sT₄ の精製:

mtx 選択条件下、850 ml ローラーポトル中に拡散させた付着性細胞培養物から、血清非含有のコンディショニング培地 (CM) を調製した。集合的に、Mg²⁺ 及び Ca²⁺ を含まないリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で細胞を 2 回洗浄し、生育培地 (ヒポキサンチン及びチミジンを含まない Ham's F12, 10% ウシ胎児血清、100 ユニット/ml ベニシリソウ及びストレプトマイシン、並びに選択濃度の mtx) を、同様の培地から血清と mtx を取り除いた培地 + 1 × ITS (インシュリン、トランスクルタリソウ及びセレン (Collaborative Research Inc.)) と置換した。

24~48 時間後、この培地を取り除き、選択生育培地と置換した。次いで、3~5 日以内に、血清非含有培地を置換し、さらにこのサイクルを 2 ヶ月以上の間、無期限に繰り返した。8,000 × g での遠心分離によって CM を清澄させた。プロテアーゼ阻害剤 PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) を 0.5 mM となるように添加し、加圧脱氷過により CM を約 10 倍に濃縮した。この濃縮 CM を 2,000 × g での遠心分離により清澄させ、プロテアーゼ阻害剤アブロチニン (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) を終濃度 5 μg/ml となるように添加した。このサンプルを直接又は -70°C での保存後に加工した。

濃縮した CM サンプルを 50mM MES [2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸]、pH 6.0 で 2 倍に希釈し、0.45 ミクロンフィルターを通して通過した。次に、このサンプルを 100 μl pAPMSF (p-アミジノフェニルメチルスルホニルフルオリド) (CalBiochem-Behring, San Diego, California) で処理し、50mM MES、pH 6.0 で平衡化した S-Sepharose[®] (スルホーブロビル) (Pharmacia P-L Biochemicals, Piscataway, New Jersey) カラムに 1.5~2.0 mg/ml-ゲルのタンパク質濃度で適用した。50mM MES、pH 6.0 中、0~0.5M NaCl の

直線的濃度勾配を用いて、このサンプルを溶出させた。約0.2M NaClで溶出したピークフラクションをプールし、PAPMSF 100 μMで処理した。 α T₄を含むフラクションをSDS-PAGE及びイムノプロットアッセイによって確認した。4℃に1時間放置した後、50mMピーストリスプロパン[1,3-ビス[トリス-(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン]、pH6.0に対して該サンプルを透析した。

このサンプルを100 μM PAPMSFで処理した後、50mMピーストリスプロパン(BTP)、pH9.0で平衡化したQ-Sepharose^R(第四級アミノエチル)カラム(Pharmacia)(5mlサンプル/ ml-ゲル)に適用した。 α T₄サンプルはQ-Sepharose^Rに結合せずに、非結合フラクション及びカラム洗浄液中に回収された。非結合サンプルをすぐにpH6.0に調整した。

最終ステップとして、50mMリン酸塩、0.15M NaCl、pH7.0で平衡化した30ミクリオンSuparose^R 12カラム(2.5×46cm)(Pharmacia)上でクロマトグラフィーを行った。カラムは3.0 ml/mlの流速で移動操作された。10mlずつ分画され、42分目のピークをバッチ操作により採取した。この方法によって、約3

μg/細胞/日を産生する細胞系に関し、全タンパク質20.0mg当たり約1.0 μgの生成物が得られた。

α T₄の特徴

物理的性質: 全蛋白質濃度は、カラーメトリックBCA蛋白分析法(ビシンコニニック酸、イリノイ州ロックフォード市のPierce Chemical Co. 提供)を用いて決定した。絶対濃度は定量的アミノ酸分析法で決定した。精製 α T₄のアミノ酸組成は標準的なアミノ酸分析法により測定したが、実験誤差(±15%)の範囲内で当該分子の予想したシークエンスと一致していることが判った。最初の20残基については、そのシークエンスは予想どおりであったが、ただlys-lys-val-val---で始まっていた。すなわち、成熟アミノ末端は予想したリーダークリップサイトに対して+3の位置から始まっていたり、当該位置で予想したシークエンスとはasnからlyss変化で異なっていた。成熟アミノ末端の位置は、マウスおよびシープCD4蛋白質の決定しておいた末端とよく一致している。asnからlyssへの変化は、シークエンシング上のエラー(単一の塩基変化)又は組み換え操作中に生じた突然変位のためであると思われる。

イムノエピトープ: モノクローナル抗体OKT₄及び

OKT₄Aは、T₄レセプターの非干渉表面エピトープを認識する(114)。これらの抗体は、イムノープロット分析において還元SDS変性蛋白質に結合しないことから、ネイティブなコンホーメーションで特異的である。次に記載するような免疫沈降法を使うと、前記両方の抗体は³⁵Sラベル培養上清から α T₄を特異的に沈殿させることができている。

60mm培養皿1つあたり 1×10^6 個の細胞を含有する α T₄-生産細胞の培養物を、1.5 mlのメチオニンとシステインを含まないがITS、170 μCi/mlの[³⁵S]メチオニンと30 μCi/mlの[³⁵S]システインを含むF12培地(カリフォルニア州コスタメサ市)のICN Biomedicals, Inc.)において、16時間37℃でラベルした。精製培地(100 μl)を等容量の沈殿バッファー(10mMのリン酸ナトリウムpH7.5、100mMのNaCl、0.1%NP-40、0.5%の脂肪非含有乾燥ミルク)で稀釈し、15分間4℃で3 μgのウサギIgGとともにインキュベートし、更に30分間4℃で30 μl(充填容量)のプロテインAセファローズビーズ(Pharmacia P-L Biochemicals)とともにインキュベートした。ブレクリアードした上清を5 μgのOKT₄、OKT₄AおよびOKT₈(ニュージャージー州Raritan市)の

Ortho Pharmaceuticals Corp. のP.Rao氏から提供を受けた)、マウスIgG(ペンシルバニア州Malvern市のCooper Biomedical)、又はウサギのα-マウスIgG(Cooper Biomedical)と30分間4℃でインキュベートした。OKT₄、OKT₄A、OKT₈、マウスIgGおよびウサギα-マウスIgGは、20 μl(充填容量)のプロテインAセファローズビーズとともに30分間4℃でインキュベートすることにより、沈殿させた。沈殿に統いて、ビーズを2回200 μlの沈殿バッファーで洗浄し、その後NP-40と非脂防乾燥ミルクを除いた200 μlの沈殿バッファーで1回洗浄した。洗浄ビーズを20 μlのサンプルバッファー(125mM Tris-HCl pH8.8、20%グリセロール、1.4 M β-メルカプトエタノール)中で5分間沸騰し、12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上でその上清の電気泳動を分析した。同じような結果が、OKT₄B、OKT₄C、OKT₄D、OKT₄E、OKT₄FおよびT₄に特異的な他のAbsについても得られた。これらの結果から、 α T₄のコンホーメーションは正確にT₄レセプターの表面領域を模倣していることが判る。

α T₄がHIVgp120と協働し得るか否か及びこの協働が

HIVのT₄細胞への結合を阻止し得るか否かを確かめるため、約5 μgの精製sT₄を、OKT₄もしくはコントロール抗体で被覆したセファローズビーズに吸着させた。次いでこのビーズを³⁵S-メチオニンラベルHIVの溶解物と混合した。

sT₄とOKT₄の結合体は120kdのエンベロープ糖蛋白質のみを共沈させる。sT₄が存在しないか又はトランスフェクションしていないCHO細胞からのコントロール上清が存在する場合には、OKT₄ビーズで沈澱するウィルス性蛋白質は何もない。また、コントロールとしてのマウス免疫グロブリン(OKT₄に調和させたアイソトープ)で被覆したセファローズビーズをsT₄とともにインキュベートしても、ウィルス性蛋白質は沈澱しない。これらの研究は、Tリンパ球の表面に存在する他の細胞表面成分をもたないsT₄がAIDSウィルスのエンベロープ糖蛋白質と特異的に共働し得ることを示している。

サイトフルオロメトリーを使って、完全なHIVのgp120とT₄との相互作用によりAIDSウィルスのT₄⁺細胞表面への結合が阻止されることが判った。T₄⁺CEM細胞をsT₄を存在させるかさせないでHIVにさらした。ウィルス吸着の

後、細胞を洗浄し、フルオレスセン結合抗-HIV抗体にさらし、フローサイトメトリーで分析した(第17図)(48)。

sT₄が存在しないと、HIVはT₄⁺CEM細胞に有効に結合する。HIVをsT₄でブレインキュベートすると、ウィルスのT₄⁺細胞への結合は阻止される(第17図)。10ナノグラムの精製sT₄は、ウィルス性蛋白質100ナノグラムの結合を阻止するのに充分である。エンベロープ糖蛋白質が全ウィルス性蛋白質の5%を含むなら、T₄対gp120のモル比が計算値で5:1ならHIVのT₄⁺細胞への結合を完全に阻止し得る。

HIVによるT₄⁺細胞の感染を阻止し得るsT₄の能力も調べた。フォトヘマグルチニン刺激ヒトリソバ球をsT₄を存在させるか又は存在させないでHIV接種材料の逐次10倍稀釈にさらし、洗浄し、そしてマイクロカルチャーに接種した。ウィルスにさらした後4日、8日および12日目にイムノアッセイを用いて感染培養の頻度を決定した(47)。このようにして、12日目の筋出細胞培養の50%を感染するのに必要な稀釈の逆数を感染性ウィルス力価ID50とした。sT₄が存在しないとき、ウィルス接種材料を用いて観察したID-50は約10⁵である。しかしながら、精製した可溶性T₄を8マイクログラム/ml存

在せると、感染性は略4 logsだけ10^{1.5}のID-50に減少する(第18図)。このHIVによる感染性の激減は、感染の全コースに亘って認められる。非特異的な阻止又はsT₄の毒性影響に対するコントロールとして、ウィルスへの初期露出後18時間たってsT₄を培養物に添加した。感染後18時間たってsT₄に露出した培養物はID-50において1 log阻止しか示さない。このことはおそらく初期感染の後ウィルス拡散が阻止されたためであろう。このように、ウィルスをsT₄とブレインキュベートした際にみられるウィルス感染性の4 log減少は、ウィルス表面上でのsT₄とgp120との特異的な協働によるものであると思われる。したがってこれらの粒子はもはや細胞表面上のT₄レセプターと相互作用することができない。1 mlあたり10⁵個の感染性粒子をsT₄の8マイクログラム/mlとブレインキュベートするときにも、4 logs阻止が認められた。10⁵個の感染性粒子/mlのウィルス調製物は、10⁹粒子/mlを含有すると計算される。仮に各粒子が1000のエンベロープ糖蛋白質を含むなら、エンベロープ蛋白質1モル当たり100個のT₄分子の割合で阻止が認めらうことになる。

構造的にインタクトなsT₄が比較的大量に利用できるなら、

T₄と抗原細胞の表面およびT₄とHIVウィルスの各相互作用のメカニズムに関する研究を前進させることができる。

T₄⁺ヘルパー細胞と抗原細胞(antigen-presenting cells)(B細胞およびマクロファージ)との相互作用の特異性は、少なくとも部分的には、T₄とクラスII MHC分子との協働によるものと思われる(105,106)。かなりの量の精製sT₄が利用できるなら、T₄とクラスII MHC分子との間の物理的な協働を直接調べることができる。

sT₄がgp120と結合し得る能力およびsT₄がin vitroでウィルス感染を阻止し得る能力は、sT₄がAIDS患者の治療に有力な抗-Wィルス剤であることを示している。

実施例4：可溶性V1V2J4可溶性T-4フラグメントの生成ベクター構築

pST₄BBV1DHFRの構築：プラスミドpST₄BBV1DHFRをつくるため、プラスミドpST₄DHFR(実施例3に記載)をEcoRIおよびXbaIで切断し、sT-4コード領域を含む小さいフラグメントを除去した。プラスミドsT₄salをXbaIおよびBbvIで切断し、リーダー領域を除いた可溶性T-4シークエンスを含む1120塩基対のコードフラ

グメントを単離した。EcoR I エンド、Kpn I サイト、Bbv I エンドをもつ合成リンカーを使って、前記フラグメントを EcoR I / Xba I 切断 p ST₄ DHFR に結合させた。このフラグメントは、上で単離した s T - 4 フラグメントにある Bbv I と相補的である。得られたプラスミドを p ST₄ BBBV IDHFR という。

OMPAST₄ の構造：プラスミド OMPAST₄ をつくるため、プラスミド OMPA, GS を Nco I および Sa II で消化し、リンカー領域を含む小さいフラグメントを除去した。OMPAs, GS は、C II リポゾーム結合シークエンスの 3' 末端で Nde I サイトに挿入されている合成シークエンスをもつ PAs I (Rosenberg et al., Meth. Enzymol., 101: 123 (1983); 米国特許第4,578,355 号明細書) の誘導体である。合成シークエンスは、OMPAs リーダーとそれに続くマルチリニアーシークエンスとを含む。合成シークエンスは実質的に次のものである。

5' -T ATG AAA AAC ACA CCT ATC GCG ATT GCA GTC GCA CTC
CCT CCT TTC CCT ACC GTA CGC CAG CCC GCC TCT AGA GTC GAC
CTA GTT AAC TAG-3'

プラスミド p U C s T₄ を Nco I および Sa II で切断し、

SCD-4 シークエンス [T-4 ネクレオチド 124-1257] を含む 1149 塩基対フラグメントを単離した。このフラグメントを Nco I / Sa II 切断 OMPA, GS に結合させて OMPAS T₄ を調製した。

OMPAST₄ Bbv I の構造：プラスミド OMPAST₄ Bbv I をつくるためプラスミド OMPAST₄ を Nae I および Xba I で切断した。この切断によって得られた s T - 4 コード領域を含む小さいフラグメントを除去した。プラスミド ST₄ BBBV IDHFR を Kpn I で切断し、得られた 3' オーバーハングを T₄ DNA ポリメラーゼで平滑末端とした。この平滑末端 DNA を次いで Xba I で切断し、CT₄ cDNA のネクレオチド 145-1257 を含む 1124 塩基対フラグメントを単離した。単離フラグメントを Nae I / Xba I 切断 OMPAST₄ プラスミドに結合し、プラスミド OMPAST₄ Bbv I を調製した。

p u c G T 4184 の構造：プラスミド p u c S t 4184 をつくるため、T - 4 cDNA [アミノ酸 (-23) から (+178) をコードする 682 bp フラグメント] から EcoR I - Nhe I フラグメントを Nhe I サイトで合成リンカー sk727/725 (Nhe I と Ava I 末端) に結合させた。sk727/725 は T - 4 アミノ酸 179-185 をコード

する。sk727/725 の Ava I 末端を、p U c S T₄ (ヒト cDNA の 1198-1257 bp を含み、T - 4 レセプター統いて TAA 終結コドンのアミノ酸 351-369 をコードする) の Ava I - Xba I フラグメントに結合した。EcoR I および Xba I 末端でフランクしたこのシークエンスを、p U C 19 ポリリンカー (sk727/725) の EcoR I および Xba I 末端で p U C 19 に挿入した。sk727/725 は実質的に次のものである。

5' gaccagaaggaggaggcgaaatgtctatgttgttgcggatttgactgccaac 3'
gctttccctcccacggttaacgtcacaaggcttaacttgacggttgagc 5'
p u c S T 4106 の構造：プラスミド p u c S T 4106 をつくるため、T - 4 cDNA の EcoR I - Ava II フラグメント (1-413 bp からなり、アミノ酸 (-) 25-87 をコードする) を Ava II サイトで合成リンカー sk791/792 (Ava II - Ava I 末端) に結合した。sk791/792 は T - 4 アミノ酸 88-104 をコードする。sk791/792 の Ava I 末端を p u c S T₄ (ヒト cDNA の 1198-1257 bp からなり、T - 4 レセプター統いて TAA 終結コドンのアミノ酸 351-369 をコードする) の Ava I - Xba I に結合させた。EcoR I および Xba I 末端でフランクしたこのシークエンスを、p U C 19 ポリリンカーの EcoR I および Xba I 末端で

p U C 19 に挿入した。sk791/792 は実質的に次のものである。

5' gaccagaaggaggaggcgaaatgtctatgttgttgcggatttgactgccaac
c c
gctttccctcccacggttaacgtcacaaggcttaacttgacggttgagc 5'

s T 4184 DHFR の構造：プラスミド s T 4184 DHFR をつくるため、p u c S T 4184 (アミノ酸 355 ~ 373 に融合したアミノ酸 -25 ~ 183 をコードする) の EcoR I - Xba I フラグメントを、s T - 4 をコードする EcoR I - Xba I フラグメントの代わりに、p s T₄ DHFR の EcoR I および Xba I 末端に結合させた。

s T 4106 DHFR の構造：プラスミド s T 4106 DHFR をつくるため、p u c S T 4106 (アミノ酸 351-369 に融合したアミノ酸 -23 から 106 をコードする) の EcoR I - Xba I フラグメントを、s T - 4 をコードする EcoR I - Xba I フラグメントの代わりに、p s T₄ DHFR の EcoR I および Xba I 末端に結合させた。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における

p S T 4184 DHFR の発現：

DHFR 欠損 CHO 細胞系 (Urlaub et al. 上記文献) である DXB - 11 細胞に、60mm皿に 5×10^5 個の細胞をシーディン

グしてから一日経過した後に、 $10\mu\text{g}$ のキャリヤー-DNA (NIH-3T3ゲノムDNA) を存在させて、リン酸カルシウム沈澱法により $10\sim30\mu\text{g}$ のpST-4184DHFRをトランスフェクションした。沈澱物を6時間後に取り出し、10%透析胎児ウシ遺伝子血清を含むがハイポキサンチン又はチミジンを含まないF12培地に置き換えた。コロニー（1つの皿あたり約100）が16日後に表われた。各皿のコロニーをプールし、拡張し、24ウェルの培養プレートに1ウェル当たり 3×10^4 個の細胞をシードした。これらの細胞を、ヌクレオシドを含まないが 80nM のメトトレキセート (mtx) を含む培地で成長させ、トランスフェクションしたdhfrとV1V2J4ミニ遺伝子の可能性ある増幅のために選択した。 8nM のmtx中で2週間後、活発的に成長する細胞を明らかに認めた。欠失変異株 (deletion mutants) の発現を調べるために各ウェル又はコロニーを集めて分析し、更に増幅のために選択したものを上に記載したのと同じ密度で24ウェル培養プレートにシードした。高レベルのV1V2J4を発現する多數のサブポビュレーションをmtxのレベルを増加しながら成長させ、dhfr転写単位とT4184 (V1V2-J4) ミニ遺伝子を更に増幅させるため選択した。いくつかの細胞系

をこのようにして誘導した。これらは少なくとも約 $2\text{pg}/\text{cell}$ /24hrs の量で欠失変異株を発現する。

mtx選択条件下に 850cm^2 ローラーボトル中に拡張した付着細胞培養物から血清を含まないならし培地 (CM) を調製した。集密的に細胞を、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含まないリン酸緩衝サリン (PBS) で2回洗浄し、成長培地 (ハイポキサンチンとチミジンを含まないHam's F12, 10%ウシ胎児血清, 100 単位/mlのベニシリン、ストレプトマイシン、および選択的濃度のmtx) を、血清とmtxを除き $1\times\text{ITS}$ (インシュリン、トランスフェリン、セレニウム (Collaborative Research Inc.)) を加えた同じ培地に置き換えた。24~48時間後培地を取り除き、選択的成長培地に変えた。血清非含有培地を次いで3~5日間以内に再び加え、このサイクルを無限に、すなわち2ヶ月以上繰り返した。CMを 8000g の遠心分離にかけてきれいにした。プロテアーゼ阻止剤PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオライド) を 0.5mM に加え、圧力膜フィルターでCMを10倍に濃縮した。この濃縮CMを 2000g の遠心分離にかけてきれいにし、プロテアーゼ阻害剤であるアブロチニン (ミズーリ州セントルイス市Sigma Chemical) を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度に加

えた。サンプルを直接処方するか又は -70°C で貯蔵した後処方した。

ウェスタンプロット分析: V1V2J4生産CHO細胞からのならし培地を濃縮し、15%ポリアクリルアミド還元ゲルにかけた。蛋白質をニトロセルロース紙に移し、認成E. Coli 誘導T₄-NS1融合分子に対するポリクローナル抗血清で検出した。この抗血清は、約25kdで移動するV1V2J4ダブルレットを特異的に認識する。これは、リーダープロセシング後のV1V2J4コードシークエンスの予想されたサイズに相当する。このダブルレットの物理的な根拠は明らかでない。これはN-リンクしたグリコシレーションの差から生じたものとも思われない。ただし、このグリコシレーションのためのT-4における2つのコンセンサスシークエンスはV1V2J4に存在しないからである。

免疫エピトープ: モノクローナル抗体OKT-4及びOKT-4A, OKT-4B, OKT4C, OKT4D, OKT4EとOKT4Fは、生来の膜結合T-4レセプター上の表面エピトープを特異的に認識する (Raoら、Cell Immunol. 80, 310 (1983))。これらの抗体は、免疫プロット

アッセイにおいて、還元された、SDS変性タンパクに結合しない生来のコンフォメーションに対して特異的である。以下の免疫吸出法を用いて³⁵S-ラベル培養上清から、双方の抗体が特異的にV1V2J4を折出することが明らかになった。

V1V2J4を生成する細胞を 60mm の培養皿あたり 1×10^6 細胞含有する培養物を、 1.5ml のメチオニン及びシステインを含まず、ITS及び $170\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の [³⁵S] メチオニンと $30\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の [³⁵S] システイン (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) を含むF12培地中、 37°C で16時間ラベル処理した。透明培地($100\mu\text{l}$)を等量の折出バッファー-10mMリン酸ナトリウムpH7.5(100mM NaCl, 0.1%NP-40°, 0.5%無脂肪ドライミルク)で希釈し、 $3\mu\text{g}$ のウサギIgGと共に4℃で15分間インキュベートした。その後、 $30\mu\text{l}$ (充填容量) のタンパクAセファロースビーズ (Pharmacia P-L Biochemicals) で4℃にて30分間処理した。予め清澄化した上清を、各々 $5\mu\text{g}$ の上記したOKT₄抗体、マウスIgG (Cooper Biomedical, Malvern, PA)、あるいはウサギα-マウスIgG (Cooper Biomedical)と共に4℃にて30分間インキュベートした。OKT₄抗体、マウスIgG及びウサギα-マ

ウス 1 g G を、20 μ l (充填容量) のタンパク A セファロースビーズと共に 4 ℃で 30 分間インキュベートして折出させた。折出ののち、ビーズを、200 μ l の折出バッファーで 2 回、200 μ l の折出バッファーから N P - 40° 及び無脂肪ドライミルクを除いた溶液で 1 回洗浄した。洗浄したビーズを 20 μ l のサンブルバッファー (125 mM トリス-HCl, pH6.8, 20% グリセリン, 1.4 M β -メルカプトエタノール) 中で 5 分間煮沸し、その上清を 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により分析した。OKT₄ を除いて、モノクローナル抗体の各々は、³⁵S でラベルした培養上清から V1V2J4 を特異的に折出させた。

HIV 結合の競合

OKT_{4A} による V1V2 γ 4 の認識は、V1V2 γ 4 が AIDS ウィルスの感受性細胞に対する結合を阻害するであろうということを示した。V1V2 γ 4 を含有するかまたはそれを欠如する CM を最初のアッセイに使用した。HIV を CM と共にインキュベートし、T-4° C EM セルラインに対するウイルスの結合は、McDougalら、supra(1985) に記載のようにして、FITC 結合抗-HIV 抗体とのインキュベーションおよ

び FACS (フルオレセイン活性化セルソーター) 分析により定量化した。V1V2J4 を生産するセルラインに由来する CM は希釈度依存的に HIV 結合を阻害したが、調和した (matched) 非生産 (DXB-11) 細胞に由来する CM ではなんらの応答も見られなかった。

タンパク V1J4 は CHO 細胞中で同様に発現した。しかし、これらの予備実験において、明らかにこのタンパクは培地中には輸送されなかった。他の組換え有機体で生産された V1J4 が OKT_{4A} に結合することを示す別の研究によると、哺乳動物の細胞培養で発現された V1J4 は HIV 結合を阻害するだろうと思われる。

実施例 5：可溶性 T₄ 断片抗体の調整

完全フロントアジュバントに 1 : 1 の容量で入れた本発明の精製可溶性 T₄ 断片 (上記のようにして調製) 50 μ g を 8 週齢の Balb/c マウスの腹腔内に注射する。その後一月毎に不完全フロントアジュバントと混合した可溶性 T₄ 断片をマウスにブーストし、尾静脈を通して採血する。血清のイムノグロブリン画分を硫酸アンモニウム沈殿により作成し、固定化した T₄ 断片を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって特定

の抗-可溶性 T₄ 断片抗体を精製する。

実施例 6：可溶性 T₄ 断片抗-イディオタイプ抗体の調製

完全フロントアジュバントに入れた本発明の精製抗-可溶性 T₄ 断片抗体 (上記のようにして調製) 50 μ g を遺伝子組成が同じで同属のマウスの腹腔内に注射し、不完全フロントアジュバントに入れた抗-可溶性 T₄ 断片抗体を毎月ブーストする。融合の 4 日前、3 日前および 2 日前に、生理食塩水に入れたイムノグロブリン 50 μ g をマウスの腹腔内にブーストする。次に、既に記載されており本発明が係る分野で公知の手段に従って、脾細胞を P3X63 AG8.653 非分泌性ミエローマ細胞と融合する。2 週間後、ハイブリドーマの上清の抗-可溶性 T₄ 断片抗体に対する結合能をラジオイムノアッセイによってスクリーニングする。次いで、陽性のクローニについて、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ糖タンパクおよび AIDS ウィルスに対して結合する能力を検定する。また、「ワニステップ」法を用いて、完全フロントアジュバントに入れた可溶性 T₄ 断片をマウスの腹腔内に注射し、生理食塩水に入れた可溶性 T₄ 断片を腹腔内にブーストし、そして上記のようにしてマウス脾細胞をミエローマと融合する。その後、ハイブリドーマの上清を、可溶性

T₄ 断片抗-イディオタイプ抗体に関して検定する。

下記の文献は明細書中に引用されたものである：

REFERENCES

1. E.L. Reinherz et al., "Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation: Analysis of Normal Thymocyte and Leukemic Lymphoblasts of T Cell Lineage", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1588-1592 (1980).
2. E.L. Reinherz and S.F. Schlossman, "The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes", Cell 19: 821-827 (1980).
3. M.L. Blue et al., "Coexpression of T4 and T8 on Peripheral Blood T Cells Demonstrated by Two-color Fluorescence Flow Cytometry", J. Immunol. 134: 2281-2286 (1985).
4. E.G. Engleman et al., "Activation of Human T Lymphocyte Subsets: Helper and Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize and Respond to Distinct Histocompatibility Antigens", J. Immunol. 127: 2124-2129 (1981).
5. A.M. Kransky et al., "Long-term Human Cytolytic T-cell Lines Allospecific for HLA-DR6 Antigen Are OKT4+", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2365-2369 (1982).
6. S.C. Meuer, S.F. Schlossman and E. Reinherz, "Clonal Analysis of Human Cytotoxic T Lymphocytes T4+ and T8+ Effector T Cells Recognize Products of Different Major Histocompatibility Complex Regions", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4395-4399 (1982).
13. L. Rogozinski et al., "The T4 Surface Antigen is Involved in the Induction of Helper Function", J. Immunol. 132: 735-739 (1984).
14. S.L. Swain, "Significance of Lyt Phenotypes: Lyt2 Antibodies Block Activities of T Cells that Recognize Class I Major Histocompatibility Complex Antigens Regardless of Their Function", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7101-7105 (1981).
15. U. Landegren et al., "Selective Inhibition of Human T Cell Cytotoxicity at Levels of Target Recognition of Initiation of Lysis by Monoclonal OKT3 and Leu-2a Antibodies", J. Exp. Med. 155: 1579-1584 (1982).
16. R.M. Zinkernagel and P.C. Doherty, "MHC-restricted Cytotoxic T Cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Transplantation Antigens Determining T Cell Restriction, Specificity, Function, and Responsiveness", Adv. Immunol. 27: 52-177 (1979).
17. J. Kappler et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells in Mouse and Man: Identification of Constant and Variable Peptides", Cell 35: 295-302 (1983).
18. O. Acuto et al., "The Human T Cell Receptor: Appearance in Ontogeny and Biochemical Relationship of Alpha and Beta Subunits in IL-2 Dependent Clones and T Cell Tumors", Cell 34: 717-725 (1983).
7. W.E. Bidddison et al., "Possible Involvement of the OKT4 Molecule in T Cell Recognition of Class II HLA Antigens", J. Exp. Med. 156: 1065-1076 (1982).
8. D.R. Wilds et al., "Evidence Implicating LYT4 in Class II MHC Antigen Reactivity Monoclonal Antibody GK 15 (Anti-LYT4) Blocks Class II MHC Antigen-Specific Proliferation, Release of Lymphokines and Binding by Cloned Murine Helper T Lymphocyte Lines", J. Immunol. 131: 2178-2183 (1983).
9. S.L. Swain, "T Cell Subsets and the Recognition of MHC Class", Immunol. Rev. 74: 129-142 (1983).
10. Y. Thomas et al., "Functional Analysis of Human T Cell Subsets Defined by Monoclonal Antibodies. IV. Induction of Suppressor Cells Within the OKT4+ Population", J. Exp. Med. 154: 459-467 (1981).
11. E.G. Engleman et al., "Antibodies to Membrane Structures that Distinguish Suppressor/Cytotoxic and Helper T Lymphocyte Subpopulations Block the Mixed Leukocyte Reaction in Man", J. Exp. Med. 154: 193-198 (1981).
12. P. Marrack et al., "The Major Histocompatibility Complex-restricted Antigen Receptor on T Cells. II. Role of the LYT4 Product", J. Exp. Med. 155: 1077-1091 (1982).
19. P. Kavathas et al., "Isolation of the Gene Coding for the Human T Lymphocyte Antigen Leu-2 (T8) by Gene Transfer and cDNA Subtraction", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7688-7692 (1984).
20. D.R. Littman et al., "The Isolation and Sequence of the Gene Encoding T8: A Molecule Defining Functional Classes of T Lymphocytes", Cell 40: 237-246 (1985).
21. V.P. Sukhatma et al., "The T Cell Differentiation Antigen Leu-2/T8 is Homologous to Immunoglobulin and T Cell Receptor Variable Regions", Cell 40: 591-597 (1985).
22. S.M. Friedman et al., "OT-CLL: A Human T Cell Chronic Lymphocytic Leukemia That Produces IL-2 in High Titer", J. Immunol. 128: 935-940 (1982).
23. D.A. Thurley-Lawson, L. Chess and J.L. Strominger, "Suppression of In Vitro Epstein-Barr Infection: A New Role for Adult Human T Cells", J. Exp. Med. 146: 495-508 (1977).
24. J.W. Goding, "The Chromic Chloride Method of Coupling Antigens to Erythrocytes: Definition of Some Important Parameters", J. Immunol. Methods 10: 61-66 (1976).
25. F.L. Graham and A.J. van der Eb, "A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus DNA", Virology 52: 456-467 (1973).

26. M. Wigler et al., "Biochemical Transfer of Single-Copy Eucaryotic Genes Using Total Cellular DNA as Donor", *Cell* 14: 725-731 (1978).
27. M. Wigler et al., "Transfer of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene to Cultured Mouse Cells", *Cell* 11: 233-232 (1977).
28. J.M. Chirgwin et al., "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry* 18: 5294-5299 (1979).
29. H. Aviv and P. Leder, "Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic Acid-Cellulose", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412 (1972).
30. T. Huynh, R.A. Young and R.W. Davis, "Construction and Screening cDNA Libraries in gt10 and gt11", *DNA Cloning Techniques - A Practical Approach*, D.M. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), in press.
31. T. Maniatis et al., "The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eucaryotic DNA", *Cell* 15: 687-701 (1978).
32. H.M. Davis et al., "Cell-Type-Specific cDNA Probes and the Murine I Region: the Localization and Orientation of λ^d Alpha", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2194-2198 (1984).
33. T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory) (1982).
34. P.W.J. Rigby et al., "Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity In Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I", *J. Mol. Biol.* 111: 237-251 (1977).
35. J. Vieira and J. Messing, "The pUC Plasmids, an M13mp7-Derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing with Synthetic Universal Primers", *Gene* 19: 259-268 (1982).
36. F. Sanger, S. Nicklen and A. Coulson, "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467 (1977).
37. E. Southern, "Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *J. Mol. Biol.* 98: 503-517 (1975).
38. G.M. Church and W. Gilbert, "Genomic Sequencing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995 (1984).
39. R.H. Scheller et al., "A Family of Genes that Codes for ELM, a Neuropeptide Eliciting a Stereotyped Pattern of Behavior in Aplysia", *Cell* 33: 707-719 (1983).
40. K. Zinn, D. DiMasio and T. Maniatis, "Identification of Two Distinct Regulatory Regions Adjacent to the Human Beta-Interferon Gene".
41. C. Terhorst et al., "Further Structural Studies of the Heavy Chain of HLA Antigens and Its Similarity to Immunoglobulins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4002-4006 (1977).
42. J.A. Medo, L.C. Harrison and J. Roth, "Binding of Insulin Receptors to Lectins: Evidence for Common Carbohydrate Determinants on Several Membrane Receptors", *Biochemistry* 20: 3385-3393 (1981).
43. U.K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature* 227: 680-685 (1970).
44. R. Mann, R.C. Mulligan, and D. Baltimore, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus", *Cell* 33, 153-159 (1983).
45. F. Barre-Sinoussi, et al., "Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", *Science* 220, 868-871 (1983).
46. J.S. McDougal, et al., "Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen", *J. Immunol.* 135, 3151-3162 (1985).
47. J.S. McDougal, et al., "Immunassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV)", *J. Immunol. Meth.* 76, 171-183 (1985).
48. J.S. McDougal, et al., "Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule", *Science* 231, 382-385 (1986).
49. C.B. Reimer, et al., "Standardization of ligand binding assays for alpha-fetoprotein. In Immunofluorescence and Related Staining Techniques. W. Knapp, K. Holubar, and G. Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Holland Press) p. 169 (1978).
50. M.B. Wilson and P.K. Nakane, "Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Holubar, and G. Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Holland Press), p. 215 (1978).
51. J. Porath, R. Axen, and S. Ernback, "Chemical coupling of proteins to agar", *Nature* 215, 1491-1493 (1967).
52. B.J. Poiesz, et al., "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7415-7419 (1980).
53. P. Clephane, K. Nagy, and R.A. Weiss, "Pseudotypes of human T-cell virus types 1 and 2".

- Neutralization by patients' sera, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2886-2889 (1984).
54. A.G. Dalgleish, et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, Nature 312, 763-766 (1984).
55. M. Popovic, et al., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS, Science 224, 497-500 (1984).
56. K. Nagy, et al., Human T-cell leukemia virus type I: induction of syncytia and inhibition by patients' sera, Int. J. Cancer 32, 321-328 (1983).
57. D.M. Neville and H. Grossman, Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate, Methods Enzymol. 32, 92-102 (1974).
58. A. Helenius, et al., On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells, J. Cell. Biol. 84, 404-420 (1980).
59. R.D. Cone and R.C. Mulligan, High-efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retroviruses with broad mammalian host range, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6349-6353 (1984).
- Ekblom, eds. (New York: Academic Press), in press (1984).
60. F.W. Alt et al., "Probes for Specific mRNAs by Subtractive Hybridization: Anomalous Expression of Immunoglobulin Genes", in Eucaryotic Gene Regulation, R. Axel, T. Maniatis and C.F. Fox, eds. (New York: Academic Press), pp. 407-419 (1979).
61. M. Kozak, "Comparison of Initiation of Protein Synthesis in Prokaryotes, Eucaryotes and Organelles", Microbiol. Rev. 47: 1-45 (1983).
62. L. Hood, M. Kronenberg and T. Hunkapiller, "T Cell Antigen Receptors and the Immunoglobulin Supergene Family", Cell 40: 225-229 (1985).
63. S. Tonegawa, "Somatic Generation of Antibody Diversity", Nature 302: 575-581 (1983).
64. J. Kyte and R.F. Doolittle, "A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein", J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982).
65. G. von Heijne, "Patterns of Amino Acids Near Signal-Sequence Cleavage Sites", Eur. J. Biochem. 133: 17-21 (1983).
66. E.A. Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services), p. 281 (1983).
67. A.J. Williams et al., "Cell Surface Glycoproteins and the Origins of Immunity", in the Proceedings of the Sigrid Juselius Symposium, L.C. Andersson, C.G. Gahmberg and P.
75. J. White, M. Kielian and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses, Quart. Rev. Biophys. 16, 151-195 (1983).
76. M. Marsh, The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis, Biochem. J. 218, 1-10 (1984).
77. M. Kielian and A. Helenius, Entry of alphaviruses. In the Togaviridae and Flaviviridae, S. Schlesinger and M.J. Schlesinger, eds., (Plenum Publishing Corp.), pp. 97-119 (1986).
78. S. Ohkuma, and B. Poole, Fluorescence probe measurements of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3327-3331 (1978).
79. F.R. Maxfield, Weak bases and ionophore rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts, J. Cell. Biol. 95, 676-681 (1982).
80. A. Helenius, M. Marsh, and J. White, Inhibition of Semliki Forest virus penetration by lysosomotropic weak bases, J. Gen. Virol. 58, 47-61 (1982).
81. R.T. Johnson and J.C. McArthur, AIDS and the brain, TINS 5, 51-54 (1982).
70. P.J. Madden, et al., The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family, Cell 42, 93-104 (1985).
71. R.A. Adams, A. Flowers and B.J. Davis, Direct implantation and serial transplation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2, Can. Res. 28, 1121-1125 (1968).
72. G.O. Gey, W.D. Coffman and M.T. Kubicek, Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, Cancer Res. 12, 254-265 (1952).
73. R.J.V. Pulvertaft, Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma), Lancet I, 238-240 (1964).
74. H.J. Dimmock, Initial stages of infection with animal viruses, J. Gen. Virol. 42, 1-22 (1982).

82. P.M. Snow, M. Van de Rijn and C. Terhorst, "Association Between the Human Thymic Differentiation Antigens T6 and T8", *Eur. J. Immunol.*, in press (1985).
83. P.M. Snow and C. Terhorst, "The T8 Antigen is a Multimeric Complex of Two Distinct Subunits on Human Thymocytes but Consists of Homomultimeric Forms on Peripheral Blood T Lymphocytes", *J. Biol. Chem.* 258: 14675-14681 (1983).
84. C. Terhorst et al., "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T4 and T5", *Science* 209: 520-521 (1980).
85. W.H. Hildemann, "Immunocompetence and Allo-geneic Polymorphism Among Invertebrates", *Transplantation* 27: 1-3 (1979).
86. V.L. Scofield et al., "Protochordate Allore-cognition is Controlled by a MHC-like Gene System", *Nature* 295: 499-502 (1982).
87. T.L. Lentz, et al., Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor ?, *Science* 215: 182-184 (1982).
88. J.D. Fingerroth, et al., Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4510-4514 (1984).
89. P.E. Tambourin, et al., The physiopathology of Friend leukemia, *Leukemia Res.* 1, 117-129 (1977).
90. A. Oliff, et al., Isolation of transplantable erythroleukemia cells from mice infected with helper-independent Friend murine leukemia virus, *Blood* 58, 244-254 (1981).
91. J.Z. Silver and J.M. Fredrickson, Suscep-tibility to Friend helper virus leukemias in CXB recombinant inbred mice, *J. Exp. Med.* 158, 1693-1702 (1983).
92. P.A. Chatis, et al., Role for the 3' end of the genome in determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4408-4411 (1983).
93. P.A. Chatis, et al., A 3' end fragment encompassing the transcriptional enhancers of nondefective Friend virus confers erythro-leukemogenicity on Moloney leukemia virus, *J. Virol.* 52, 248-254 (1984).
94. A. Bosze, H.J. Thiesen and P. Charnay, A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the long terminal repeat of the Friend murine leukemia virus, *EMBO J.* 5, 1615-1623 (1986).
95. A.N. Barclay, et al., Immunoglobulin-related structures associated with vertebrate cell surfaces, in press.
96. M.O. Dayhoff, W.C. Barker and L.T. Hunt, Establishing homologies in protein sequences. In *Methods in Enzymology. Enzyme Structure Part I*, C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, eds. (New York: Academic Press), pp. 524-545 (1983).
97. Y. Yanagi, et al., A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, *Nature* 308, 145-149 (1984).
98. G.K. Sim, et al., Primary structure of human T-cell receptor -chain, *Nature* 312, 771-775 (1984).
99. H. Saito, et al., A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 312, 38-40 (1984).
100. H. Saito, et al., Complete primary structure of the E chain and gene of the mouse major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5520-5524 (1983).
101. M. Isobe, et al., The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4399-4402 (1986).
102. J.M. Roberts and R. Axel, Gene Amplification and Gene Correction in Somatic Cells, *Cell* 33, 105-115 (1983).
103. D.S. Pfarr, G. Sathe and M.E. Reff, A Highly Modular Cloning Vector for the Analysis of Eucaryotic Genes and Gene Regulatory Ele-ments, *DNA*, 4, 461-467 (1985).
104. G. Urlaub and L.A. Chasin, Isolation of chineese Hamster Cell Mutants Deficient In Dihydrofolate Reductase Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216-4220 (1980).
105. Gay, D. et al., *Nature* 328: 626-629 (1987).
106. Sleckman, B.D. et al., *Nature* 328: 351-353 (1987).
107. Yanisch-Perron, et al., *Gene* 33: 103 (1985).
108. Berg, P., et al. *Mol. Cell. Biol.* 3: 246 (1983).
109. Subramani, et al., *Mol. Cell Biol.* 1: 854 (1981).
110. Frayne, et al., *Mol. Cell Biol.* 4: 2921 (1984).
111. Schumperli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 257 (1982).
112. Gross, et al., *Mol. Cell Biol.* 5: 1015 (1985).
113. Pfarr, et al., *DNA* 5: 115 (1986).
114. Rao, et al., *Cell Immunol.* 80: 310 (1983).

115. McClure, et al., Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation 9: 345 (1982).
116. Urlaub, et al., Cell 33: 405 (1983).
117. Kim, et al., Cell 42: 129 (1987).
118. Wigler, et al., PNAS USA 76: 1373 (1979).
119. Copeland, et al., Cell 17: 993 (1979).
120. Sattentau, et al., Science 234: 1120 (1986).
121. Greenstein, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 134 (1987).
122. Gay, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 127 (1987).

Figure 1A

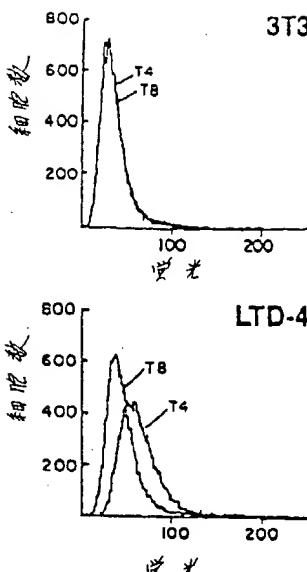


Figure 1B

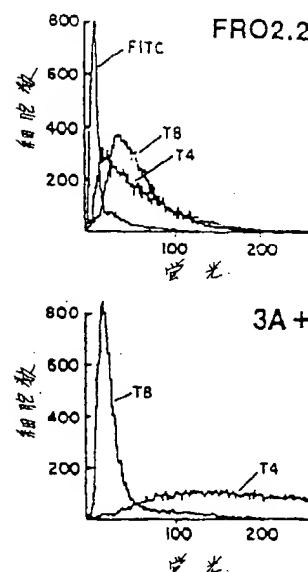


Figure 1C

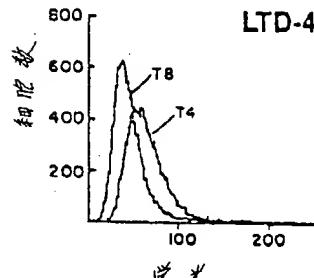


Figure 1D

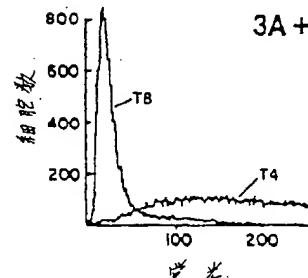


FIGURE 2

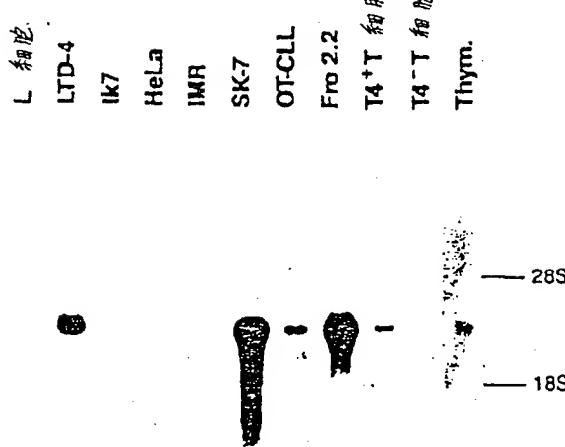


Figure 3A

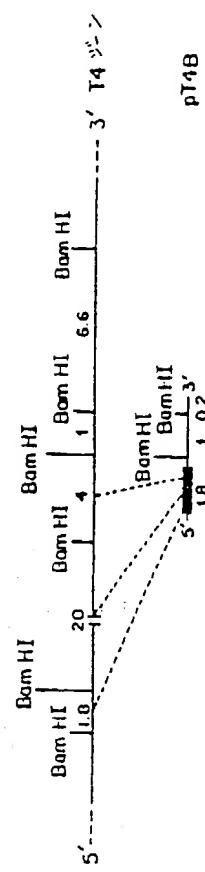


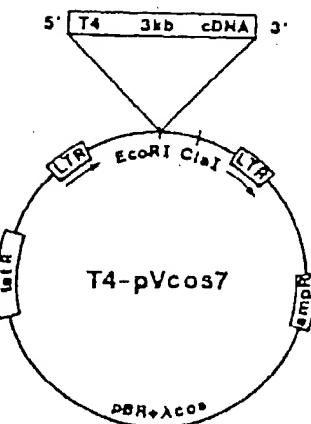
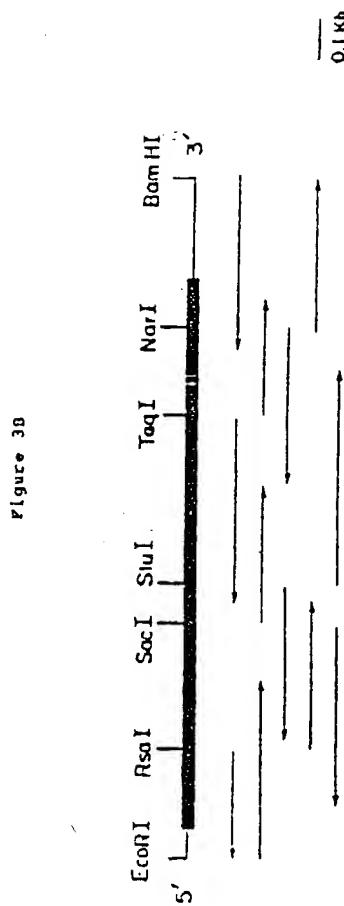
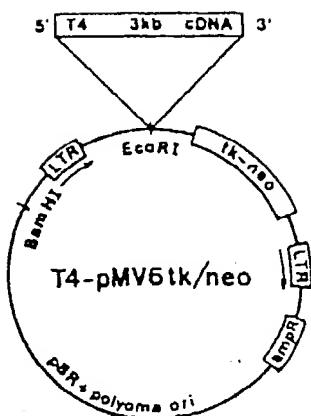
Figure 3C₁Figure 3C₂

FIGURE 4

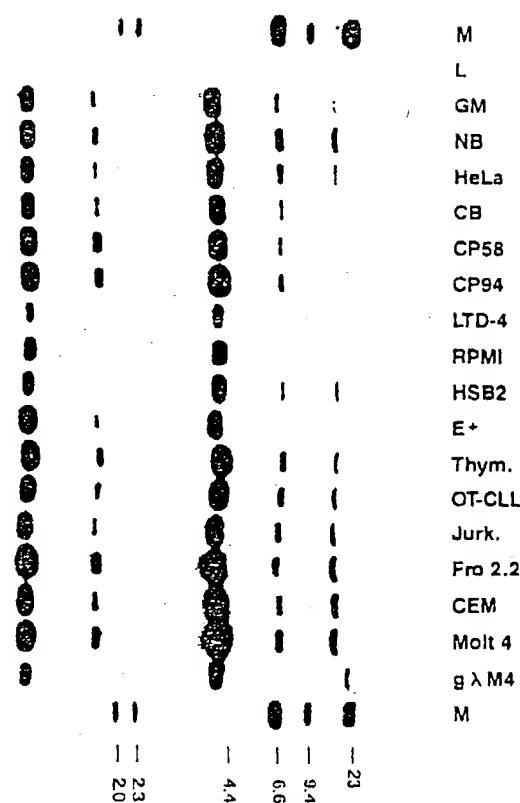


FIGURE 5

a b c d e f

200 —
97.4 —
68 —
43 —
25.7 —

Figure 6A₁

6A ₁	6A ₂
6B ₁	6B ₂

CAACCCAGACCCCTGCGATTTTGCGCTAGTGTCTACTGCTACCCCTTCCTCTCTC
 -10 +1 +1
 leu val leu gln leu ala leu leu pro ala ala thr gl. gly asn lys
 CTC CTG CTG CAA CTG CGG CTC CTC CCA GCA CCC ACT CAG CCA AAC AAA
 ← →
 +20 +30
 thr ala ser gln lys lys ser ile gln phe his trp lys asn ser asn
 ACA CCT TCC CAG AAG ACC ATA CAA TTC CAG AAA AAC TCC AAC
 ← →
 +50 +60
 gly pro ser lys leu asn asp arg ala asp ser arg arg ser leu trp
 CCT CCA TCC AAC CTG AAC CAT CCT CCT GAC TCA AGA AGC ACC CTT TGG
 ← →
 +80 +90
 glu asp ser asp thr tyr ile cys glu val glu asp gln lys glu glu
 GAA GAC TCA GAT ACT TAC ATC TGT CAA CTG GAG GAC CAG AAG GAC GAC
 ← → V1
 +110 +120
 his leu leu gln gly gln ser leu thr leu thr leu glu ser pro pro
 CTC CTC CAA CGG CGG ACC CTC ACC CTG ACC TTC GAG ACC CCC CCT
 ← → V2
 +140 +150
 asn ile gln gly gln lys thr leu ser val ser gln leu glu leu gln
 AAC ATA CGG CGG AAG ACC CTC TCC CTG TGT CAG CTG GAG CTC CAG
 ← →
 +170 +180
 lys val glu phe lys ile asp ile val leu ala phe gln lys ala
 AAG CTG GAG TTC AAA ATA GAC ATC GTG GTG CTA CCT TTC CAG AAC ACC
 ← → J2
 +200 +210
 ser phe pro leu ala phe thr val glu lys leu thr gly ser gly glu
 TCC TTC CCA CTC CCC TTT ACA CTT CAA AAC CTG AGC ACC ACT CCT GAG
 ← →

Figure 6A₂Figure 6A₁

-20
 met asn arg gly val pro phe arg his leu leu
 GCGAAGCCGACAA ATG AAC CGG GCA GTC CCT TTT AGG CGC TTG CTT 103
 ← →
 +10 *
 val val leu gly lys lys gly asp thr val glu leu thr cys
 CTG CTG CTG GGC AAA AAA CGG GAT ACA GTG GAA CTG ACC TGT 198
 ← → V1
 +40
 gln ile lys ile leu gly asn gln gly ser phe leu thr lys
 CAG ATA AAG ATT CTG GGA ATT CGG TCC TTC TTA ACT AAA 288
 ← →
 +70
 asp gln gly asn phe pro leu ile ile lys asn leu lys ile
 GAC CAA CGA AAC TTC CCC CTG ATC ATC AAG AAC CCT AAG ATA 378
 ← →
 +100
 val gln leu leu val phe gly leu thr ala asn ser asp thr
 GTG CAA TTG CTA CTG TTC GCA TTG ACT GCG AAC TCT CGC ACC 468
 ← → J1
 +130 *
 gly ser ser pro ser val gln cys arg ser pro arg gly lys
 CCT ACT ACC CCC TCA CTG CAA TGT AGG ACT CCA AGG CGT AAA 558
 ← →
 +160 *
 asp ser gly thr trp thr cys thr val leu gln asn gln lys
 GAT ACT GCG ACC TCG ACA TCC ACT GTC TTG CGG ANC CGG AAG 648
 ← → V2
 +190
 ser ser ile val tyr lys lys glu gly glu val glu phe
 TCC AGC ATA GTC TAT AAG AAA GAG CGG GAA CGG CTG CGG TTC 738
 ← → V3
 +220
 leu trp trp gln ala glu arg ala ser ser lys ser trp
 CTG TCC TCC CAG CGG AGG CCT TCC TCC ACT GCG TGT GCG CTC AGT TCC 828

+230 +240
 ile thr phe asp leu lys asn lys glu val ser val lys arg val thr
 ATC ACC TTT GAC CTG AAG AAC AAG GAA GTG TCT GIA AAA CGG CCT ACC
 ← →
 +260 CHO
 leu thr leu pro gln ala leu pro gln tyr ala gly ser gln asn leu
 CTC ACC CTC CCT CAG CGC CCT TTG CCT CAG TAC CCT CCT CGA AAC CTC
 ← → J3
 +290 CHO
 val asn leu val val met arg ala thr gln leu gln lys asn leu thr
 GTG AAC CTG GTG GTG ATC AGA CCC ACT CAG CTC CAG AAA ATT TTT ACC
 ← → V4
 +320 CHO
 leu lys leu glu asn lys glu ala lys val ser lys arg gln lys ala
 TTG AAA CTG GAG AAC AAG GAG GCA AAG GTC TCG AAG CGG CGG AAG CGG
 ← →
 +350 CHO
 leu ser asp ser gln gln val leu leu glu ser asn ile lys val leu
 CTC ACT GAC TCG CGA GCA GTC CTG CTC GAA TCC AAC ATC AAG CCT CTC
 ← → J4
 +380 CHO
 leu gly gly val ala gly leu leu leu phe ile gly leu gly ile phe
 CTG CGG CGC GTC CGC CGC CTC CTG CTT TTC ATT CGG CTA CGC ATC TTC
 ← → TM
 +410 CHO
 met ser gln ile lys arg leu leu ser glu lys thr cys gln cys
 ATG TCT CAG ATC AAG AGA CTC CTC ACT CAG AAC AAG ACC TCC CGA TCC
 ← →

GCGCAGCCAGATGCCACTGCGCTCCCGAGGTGTCGCCCCCGGTTCTCTCGGGACC
 CCATTTTCTCTCTGCTTACCCCGCCCGCTTCACTGTTGAGTGTGCTCTCTAGCTTCCACA
 CTCATTATTCCTCTCTGACCTCTCCCACTGCTCTGCTCTAGCTTCCACA 1742

Figure 53.

gln asp pro lys leu gln met gly lys lys leu pro leu his
 CAG GAC CCT AAG CTC CAG ATG CCC AAG AAG CTC CGG CTC CAC 918
 _____ V3

+280
 thr leu ala leu glu ala lys thr gly lys leu his gln glu
 ACC CTG GGC CCT GAA CCC AAA ACA CGA AAG TTG CAT CAG GAA 1008
 _____ ←

● cys glu val trp gly pro thr ser pro lys leu met leu ser
 TCT GAG GTG TGG GCA CCC AAC TCC CCT AAG CTG ATG CTG ACC 1098
 _____ ←

+340
 val trp val leu asn pro glu ala gly met trp gln cys leu O
 GTG TGG GTG CTG AAC CCT GAG CGG CGG ATG TGG CAG TGT CTC 1188
 _____ V4 ←

+370
 pro thr trp ser thr pro val gln pro met ala leu ile val
 CCC ACA TGG TCC ACC CGG GTG CAG CCA ATG CCC CTG ATT CTG 1278
 _____ ←

phe cys val arg cys arg his arg arg arg gln ala glu arg
 TTC TGT CTC AGG TCC CGG CAC CCA ACC CCC CAA GCA GAG CGG 1368
 _____ ← CYT ←

+400
 pro his arg phe gln lys thr cys ser pro ile
 CCT CAC CGG TTT CAG AAG ACA TGT ACC CCC ATT TGA GGCACCA 1459
 _____ ← CYT ←

GGTTTAATCAGACCGCTGCTTACGCCATTTCCTTACCTCAACGCTAGGCGCTTCT 1697

Figure 8

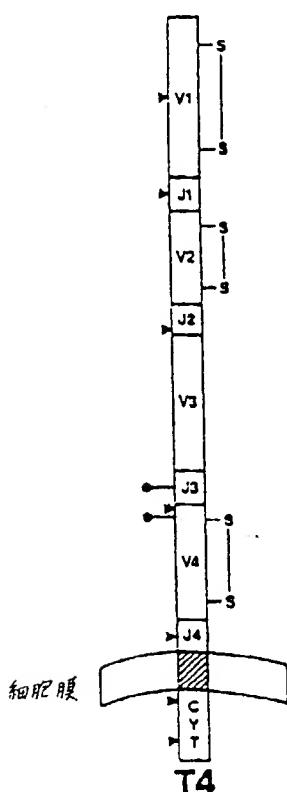


FIGURE 7

BP T4

66.2 —

45 —

31 —

215 —

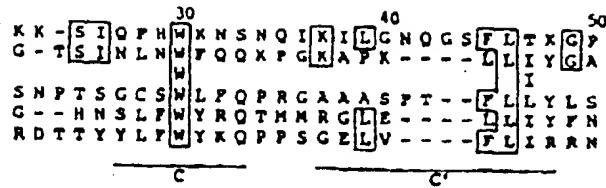
Figure 9A.

T4	- - O G N X V V - - L G K X -	10	T A S O
V-kappa	D V Q M I Q S P S S I S A S L C	G D T V E L T C T	
Inv.	T	G Q I V T M I C Q A S Q	
T8	- S Q F R V Y S P L D R T W N L I	C C	
TY35	D A C Y V I O S F R M H E V T E M	G E U V T L R C K P I S	
KPB-MLT α	- O K V T Q A Q T E I S V V E K E D V T L D C V Y E T		

T4	S K L - - - - - N D R A D S R R S L W D O C H	60
V-kappa	S I L E - - - - - G V P S R F S G C R Y G T D - -	
Inr.	G R F G S	
T8	Q N K P K A A E - G L D T O R F R F S C X R - L C D T -	
T35	H N V P I D D - S G M P E D R F S A K X M P N - - A S	
KPB-MLTA	S F D E O N E I S G - - - R Y S W N F Q K - S T S S	

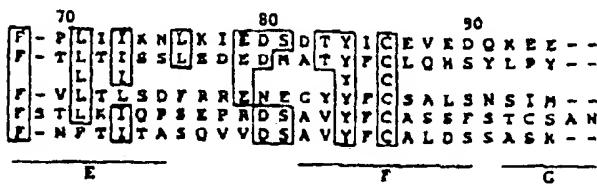
Figure 9A₂

Figure 99



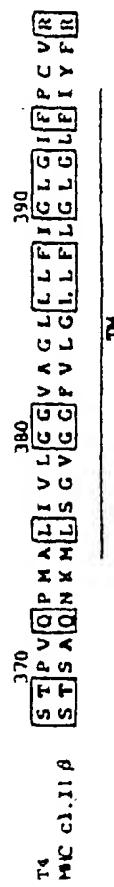
T4 J

KPB-MLT α J



100	L	V	F	G	L	-	T	A	N	S	D	T	H
	L	Y	F	G	E	G	T	R	L	T	V	L	-
	W	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G
-	T	F	G	G	G	T	X	K	L	E	I	K	R
I	I	F	G	S	J	T	R	L	S	I	R	-	

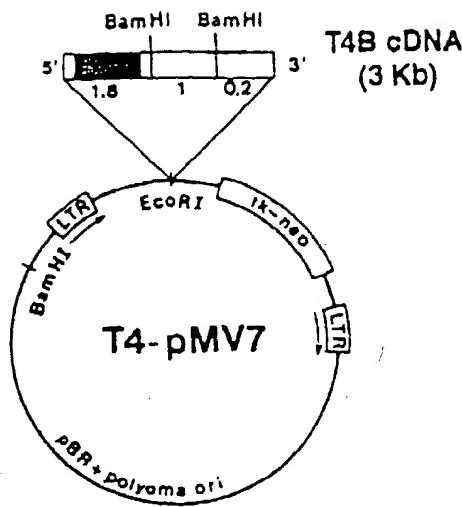
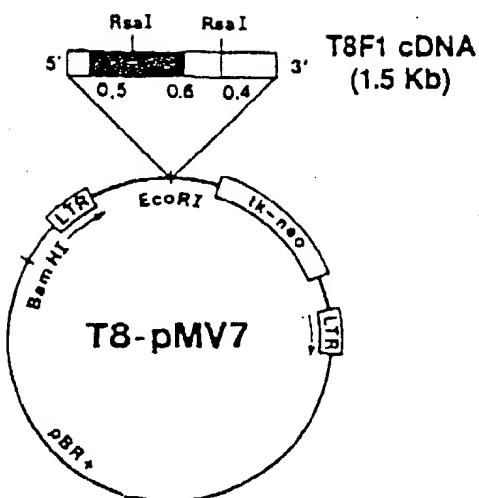
Figure 9c



triage 10



—18 Kb —20 Kb —4 Kb —11 Kb +15.6 Kb —

Figure 11A₁Figure 11A₂Figure 11B₁

11B ₁	11B ₂
------------------	------------------

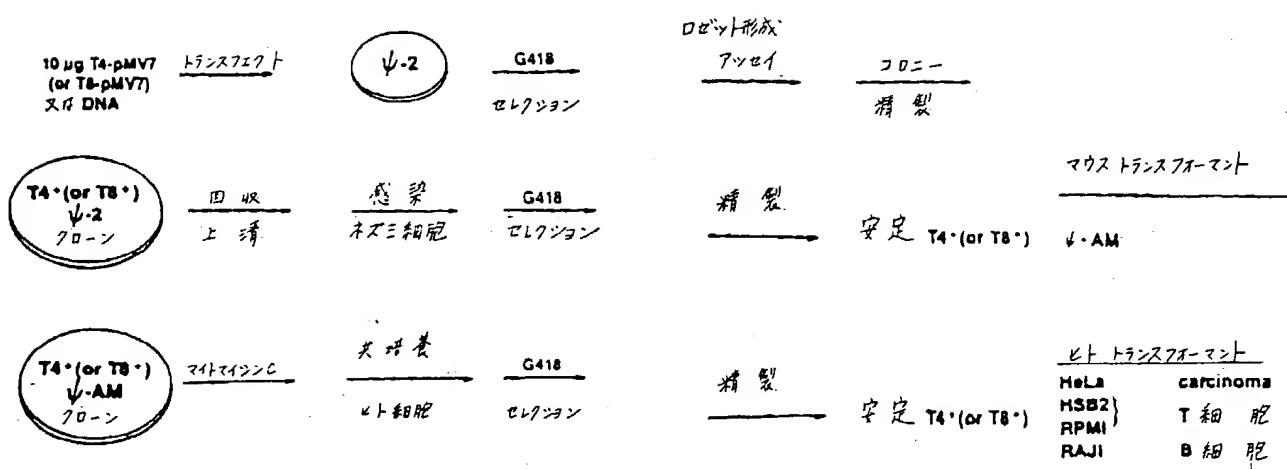
Figure 11B₂

Figure 12

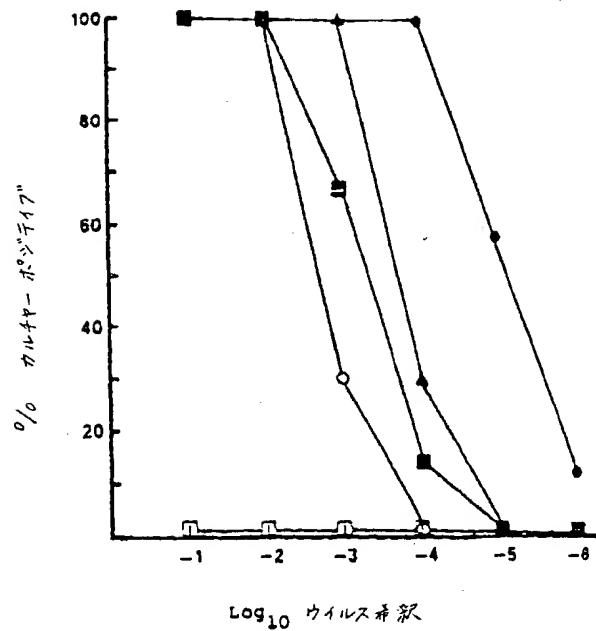
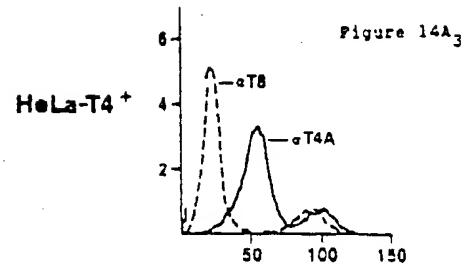
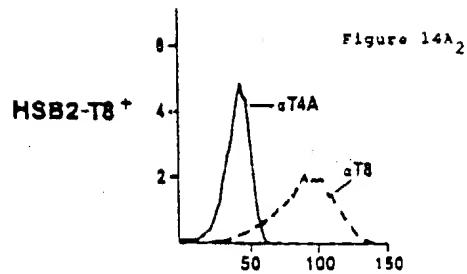
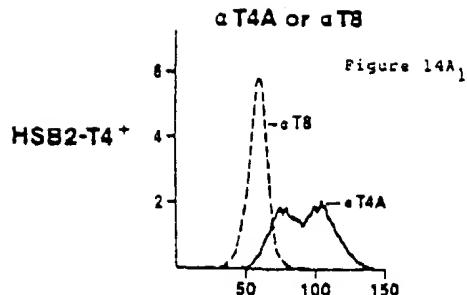


FIGURE 13A



FIGURE 13B



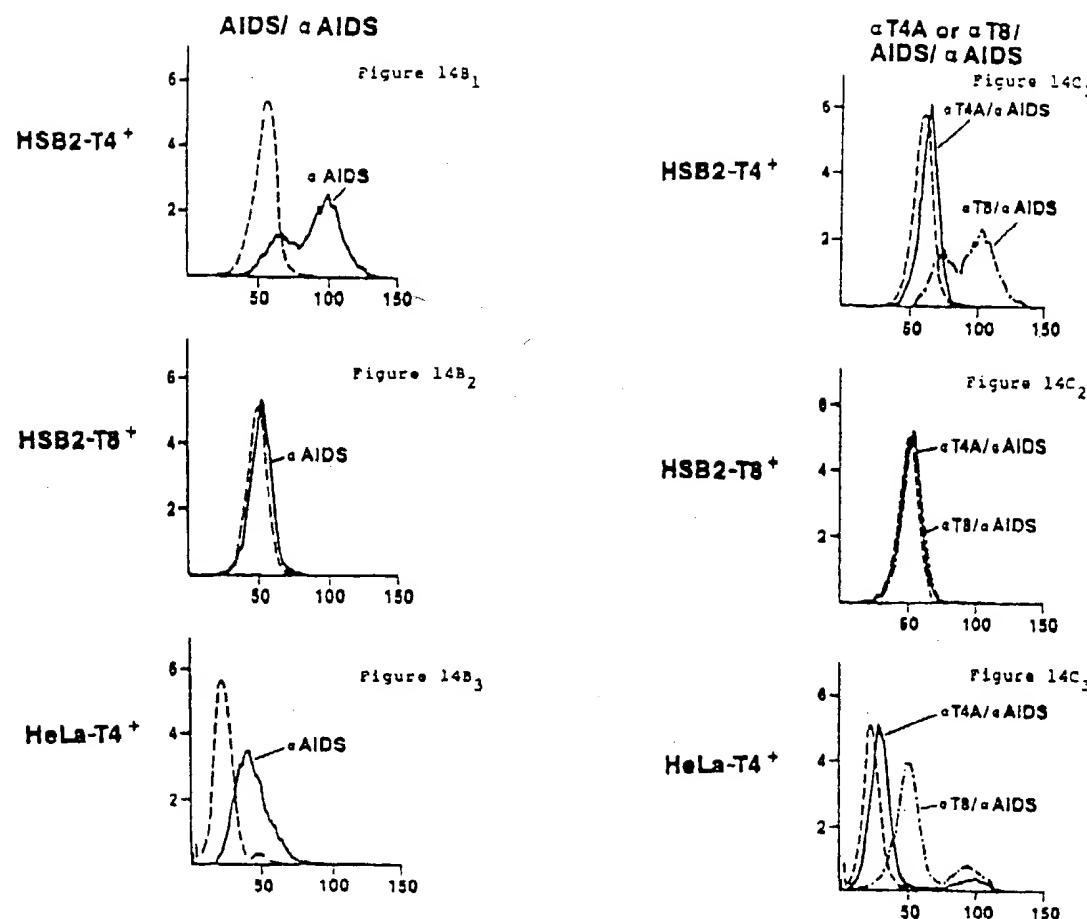


FIGURE 15A

FIGURE 15B

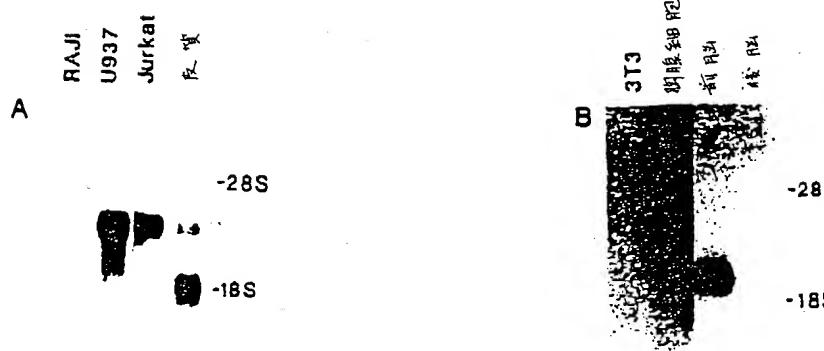


Figure 16

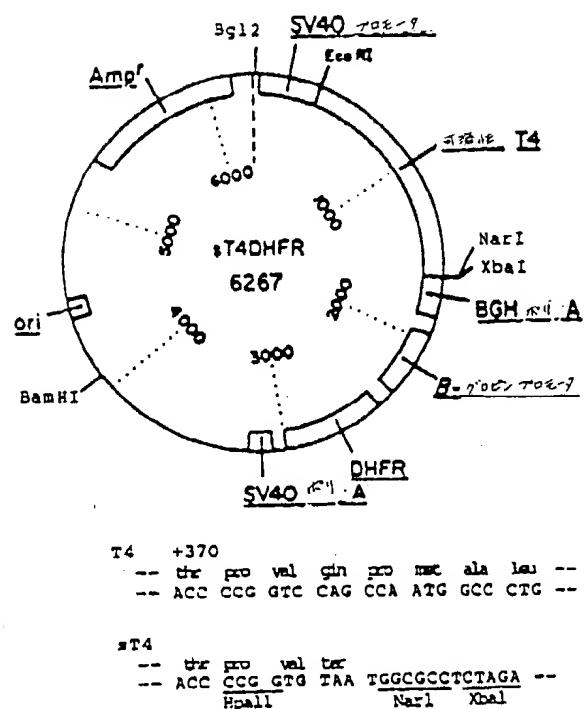


Figure 17

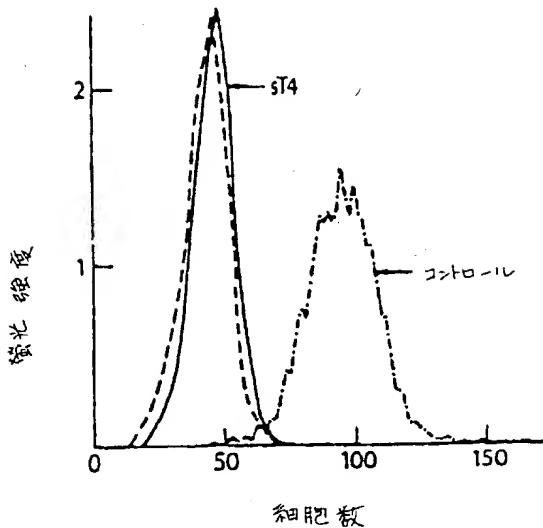


Figure 18A

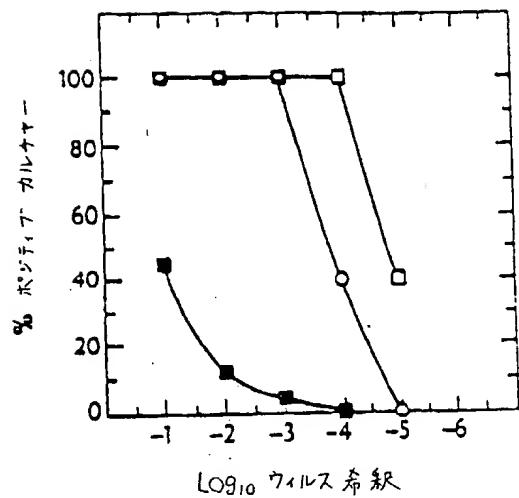
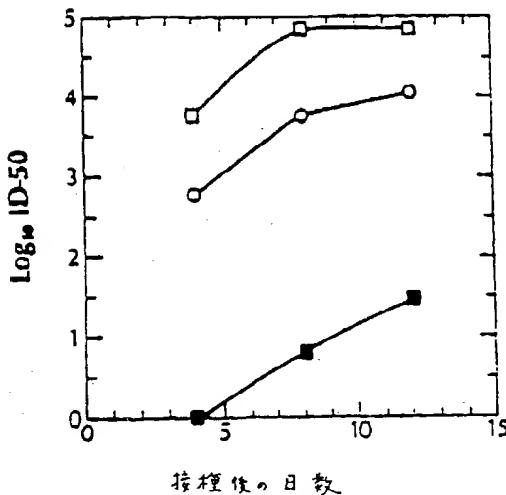


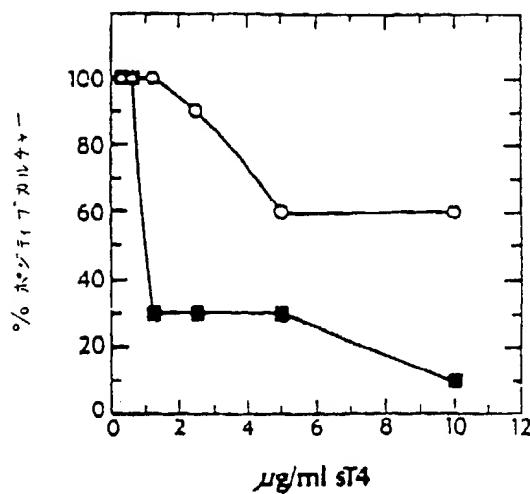
Figure 18B



手続補正書

平成元年11月30日 通

Figure 18C



特許庁長官 吉田文毅

1. 事件の表示 PCT/US 89/00762

2. 発明の名称 可溶性T4の誘導体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ザ・トラステイズ・オブ・コロンビア・ユニヴァーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニュー・ヨーク (ほか1名)

4. 代理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号160) 電話(03) 354-8623
(6200) 弁理士 川口義雄 (ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象 明細書の翻訳文及び請求の範囲の翻訳文の簡

8. 補正の内容

(1) 鮮明な明細書の翻訳文及び鮮明な請求の範囲の翻訳文を別紙の通り補充する。

方式

特許庁
1.12.1
国際出願事務局

国際調査報告

International Application No. PCT/US89/00762

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (or general classification number, where applicable, without IPC)

According to International Patent Classification (IPC) or to non-IPC Classification and IPC

Int. Cl. 4 - C12N 7/001 AS1K 27/02; C07K 15/00
U.S. Cl. - 433/240.1, 233, 3201 +24/00-214/13; 150/250, 324

X FIELDS SEARCHED

Classification System	Minimum Documentation Searched ¹	Classification System
U.S.	433/240.1, 233, 3201 +24/00; 214/13; 150/250, 324	

Documents Searched other than Minimum Documentation
as the extent that such Documents are included in the Fields Searched²

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT³

Category ⁴	Claims of Document, * with indication, where appropriate, of the relevant passages ⁵	Relevant to Claim No. ⁶
X	Cell, vol. 42, issued August 1983, Madden, "The Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding The T Cell Surface Protein T4: A New Member Of The Immunoglobulin Gene Family", pp. 93-104, See entire document.	1-3 and 5-14
Y	ICSU (INTERNATIONAL COUNCIL OF SCIENTIFIC UNIVERISITIES) SHORT REPORTS, vol. 2, Advances in Gene technology: Molecular Biology of the Immune System, issued 1985, Littman, "The Isolation and structure of the Genes Encoding The Human T Cell Molecules T4 and T8", pp. 233, 234, See The entire article	1-3

* General categories of cited documents: ¹ A document referring to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
*2 A document referring to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
*3 A document which may show, besides its present claimed or proposed subject matter, one or more other features which constitute an essential feature of another document or other document(s); see comments
*4 A document referring to an art disclosed, one, or both, of which is not contained in the International Patent Classification
*5 A document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed
*6 A document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application that cited it to understand the principle or theory underlying the invention

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE⁷

This International search report has not been conducted in respect of certain claims under Article 17(2) (d) for the following reasons:

Claim numbers because they relate to subject matter it is reported to be searched by the Authority, namely:

Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements so such an extent that no meaningful International search can be carried out*, specifically:

Claim numbers indicate that the document claim is drafted in accordance with the second and third sentence of PCT Rule 6.4(c).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING⁸

This International Searching Authority found multiple inventions in the international application as follows:

All required additional search fees were timely paid by the applicant, one International search report covers all searchable claims of the International application.

As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

The required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

As an alternative claim could be rejected without often publishing an assessment fee, the International Searching Authority did not charge any of any additional fee.

Remarks on Fees

The applicant search fees were accommodated by applicant's attorney.

No attorney accommodated the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/200 (Supplemental form) (2 Rev. 11-87)

International Application No. PCT/US89/00762

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

* Nature, Vol. 29, Issued December 1980, Klatzmann, "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAU", pp. 767 and 768, See the entire article.

A Science, Vol. 209, Issued 25 July 1980, Terhorst, "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T4 and T8", pp. 520 and 521, See the entire document

OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE⁷

This International search report has not been conducted in respect of certain claims under Article 17(2) (d) for the following reasons:

Claim numbers because they relate to subject matter it is reported to be searched by the Authority, namely:

Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements so such an extent that no meaningful International search can be carried out*, specifically:

Claim numbers indicate that the document claim is drafted in accordance with the second and third sentence of PCT Rule 6.4(c).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING⁸

This International Searching Authority found multiple inventions in the international application as follows:

All required additional search fees were timely paid by the applicant, one International search report covers all searchable claims of the International application.

As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

The required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

As an alternative claim could be rejected without often publishing an assessment fee, the International Searching Authority did not charge any of any additional fee.

Remarks on Fees

The applicant search fees were accommodated by applicant's attorney.

No attorney accommodated the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/200 (Supplemental form) (2 Rev. 11-87)

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Content of Document, with reference, where appropriate, of the report number	Reference to Claim No.
Y	Nature, Vol. 312, issued December 1984, Delgleish, "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus", pp. 763-766, See the entire document	1-5
X	Cell, Vol. 50, Issued 11 September 1987, Lasky, "Delimitation of a Region of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp 120 Glycoprotein critical for interaction with the CD4 Receptor", pp. 375-385, See entire article	1-14

第1頁の続き

- | ⑤Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 府内整理番号 |
|---|------------|---|
| A 61 K 37/02
C 07 K 13/00
C 12 N 5/10
15/48
//(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91) | ADY
ZNA | 8615-4C
8619-4H |
| ⑦発明者 アクスル, リチャード | | アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・10027、ニュー・ヨーク、リバーサイド・ドライブ・445 |
| ⑦発明者 スウイート, レイモンド・ダブリュ | | アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19004、バラ・シンワイド、エッジヒル・ロード・108 |
| ⑦発明者 アーソス, ジェイムズ | | アメリカ合衆国、ミシガン・48104、アン・アーバ、ヒル・ストリート・2026 |
| ⑦出願人 スミスクライン・ベクマン・コーポレイション | | アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19101、フイラデルフィア、フランクリン・ブラザ・1 |